

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-135063

(43)Date of publication of application : 13.05.2003

---

(51)Int.Cl. C12N 15/09  
C12Q 1/02  
C12Q 1/68

---

(21)Application number : 2002-116753 (71)Applicant : CHIBA PREFECTURE  
HISAMITSU PHARMACEUT CO INC

(22)Date of filing : 18.04.2002 (72)Inventor : NAKAGAWARA AKIRA  
MIYAZAKI KO

---

(30)Priority

Priority number : 2001254974 Priority date : 24.08.2001 Priority country : JP

---

(54) NEW GENE NEDL-1

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To enable diagnosis regarding a prognosis based on the genetic information through clarifying a gene sequence relating to the prognosis about neuroblastoma, and to provide information on the function of a protein as the transcription product of the gene.

SOLUTION: A diagnostic agent and kit for the prognosis about neuroblastoma comprising a nucleic acid derived from an NEDL-1 gene or a nucleic acid probe or primer or the like utilizing NEDL-1 protein, and a diagnostic method for the prognosis using the agent or kit, are provided, respectively.

---

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 08.03.2005

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

BEST AVAILABLE COPY

3/3

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-135063

(P2003-135063A)

(43) 公開日 平成15年5月13日 (2003. 5. 13)

| (51) Int.Cl.  | 識別記号 | F I           | テ-マ-ト* (参考) |
|---------------|------|---------------|-------------|
| C 1 2 N 15/09 |      | C 1 2 Q 1/02  | 4 B 0 2 4   |
| C 1 2 Q 1/02  |      | 1/68          | A 4 B 0 6 3 |
| 1/68          |      | C 1 2 N 15/00 | A           |

審査請求 未請求 請求項の数24 O L (全 29 頁)

|              |                              |          |  |
|--------------|------------------------------|----------|--|
| (21) 出願番号    | 特願2002-116753 (P2002-116753) | (71) 出願人 | 591014710<br>千葉県<br>千葉県千葉市中央区市場町1番1号       |
| (22) 出願日     | 平成14年4月18日 (2002. 4. 18)     | (71) 出願人 | 000160522<br>久光製薬株式会社<br>佐賀県鳥栖市田代大官町408番地  |
| (31) 優先権主張番号 | 特願2001-254974 (P2001-254974) | (72) 発明者 | 中川原 章<br>千葉県千葉市中央区仁戸名町666-2 千<br>葉県がんセンター内 |
| (32) 優先日     | 平成13年8月24日 (2001. 8. 24)     | (74) 代理人 | 100088155<br>弁理士 長谷川 芳樹 (外1名)              |
| (33) 優先権主張国  | 日本 (J P)                     |          |  |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規な遺伝子 NEDL-1

(57) 【要約】

【課題】 神経芽細胞腫の予後良不良に関係する遺伝子配列を明らかにし、その遺伝子情報に基づき、予後良不良の診断を可能にすること、並びに前記遺伝子の転写産物であるタンパク質の機能に関する情報を提供する。

【解決手段】 NEDL-1 遺伝子に由来する核酸、または NEDL-1 タンパク質を利用した核酸プローブ或いはプライマー等からなる神経芽細胞腫の予後の診断剤および診断用キット、並びにそれらを用いる神経芽細胞腫の予後の診断方法。

|                       |
|-----------------------|
| FP04-0444-00WO<br>-HM |
| 05. 2. 22             |
| SEARCH REPORT         |

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の(a)または(b)の核酸を含む核酸プローブ:

(a)配列表の配列番号2に示す塩基配列の一部、またはそれと相補的な塩基配列を有する核酸;

(b)配列表の配列番号2に示す塩基配列からなる核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸、またはそれと相補的な塩基配列を有する核酸。

【請求項2】 前記核酸がDNAであることを特徴とする請求項2に記載の核酸プローブ。

【請求項3】 核酸が少なくとも20個の塩基長である請求項1または2に記載の核酸プローブ。

【請求項4】 前記核酸が配列表の配列番号2に示す塩基配列の全長である請求項3に記載の核酸プローブ。

【請求項5】 請求項1~4のいずれか1項に記載の核酸プローブを有効成分とする神経芽細胞腫の予後診断剤。

【請求項6】 以下の(a)または(b)のDNAを含むプライマー:

(a)配列表の配列番号2に示す塩基配列の一部、またはそれと相補的な塩基配列を有するDNA;

(b)配列表の配列番号2に示す塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA、またはそれと相補的な塩基配列を有するDNA。

【請求項7】 請求項6に記載のプライマーを有効成分とする神経芽細胞腫の予後診断用キット。

【請求項8】 神経芽細胞腫の臨床組織サンプルから配列表の配列番号2に示す塩基配列からなる核酸の有無を検出することを特徴とする、神経芽細胞腫の予後の診断方法。

【請求項9】 神経芽細胞腫の臨床組織サンプルから配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列からなるタンパク質の有無を検出することを特徴とする、神経芽細胞腫の予後の診断方法。

【請求項10】 (a)配列表の配列番号2に示す塩基配列の一部、またはそれと相補的な塩基配列を有する核酸、または(b)配列表の配列番号2に示す塩基配列からなる核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸、またはそれと相補的な塩基配列を有する核酸を神経芽細胞腫の臨床組織サンプルと接触させて、配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列からなるタンパク質の発現およびその量を分析することを特徴とする、神経芽細胞腫の予後の診断方法。

【請求項11】 配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列からなるタンパク質を有効成分として含むポリユビキチン化剤。

【請求項12】 ユビキチン化される基質がアミロイドβ前駆蛋白(βAPP)であることを特徴とする請求項11に記載のポリユビキチン化剤。

【請求項13】 ユビキチン化される基質がアミロイド

β前駆蛋白細胞内領域(AICD)であることを特徴とする請求項11に記載のポリユビキチン化剤。

【請求項14】 ユビキチン化される基質がスーパーオキシドジスムターゼ(SOD1)変異体であることを特徴とする請求項11に記載のポリユビキチン化剤。

【請求項15】 アミロイドβ前駆蛋白(βAPP)の調節用組成物であって、配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をアミロイドβ前駆蛋白の細胞内での発現、産生、または形成を調節するのに有効な量、含むことを特徴とする調節用組成物。

【請求項16】 アミロイドβ前駆蛋白(βAPP)の調節用組成物であって、配列表の配列番号2に示す塩基配列を有する核酸をアミロイドβ前駆蛋白の細胞内での発現、産生、または形成を調節するのに有効な量含むことを特徴とする調節用組成物。

【請求項17】 細胞に配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をアミロイドβ前駆蛋白(βAPP)の細胞内発現、産生、または形成を調節するのに有効な量、投与することからなる細胞内でのアミロイドβ前駆蛋白の発現、産生、または形成を調節する方法。

【請求項18】 細胞に配列表の配列番号2に示す塩基配列を有する核酸をアミロイドβ前駆蛋白の細胞内発現、産生、または形成を調節するのに有効な量、投与することからなる細胞内でのアミロイドβ前駆蛋白(βAPP)の発現、産生、または形成を調節する方法。

【請求項19】 スーパーオキシドジスムターゼ(SOD1)活性の調節用組成物であって、配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をスーパーオキシドジスムターゼ活性を細胞内で調節するのに有効な量、含むことを特徴とする調節用組成物。

【請求項20】 スーパーオキシドジスムターゼ(SOD1)活性の調節用組成物であって、配列表の配列番号2に示す塩基配列を有する核酸をスーパーオキシドジスムターゼ活性を細胞内で調節するのに有効な量、含むことを特徴とする調節用組成物。

【請求項21】 スーパーオキシドジスムターゼ(SOD1)が変異型であることを特徴とする、請求項19または20に記載の調節用組成物。

【請求項22】 細胞に配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をスーパーオキシドジスムターゼ(SOD1)活性を調節するのに有効な量、投与することからなる細胞内におけるスーパーオキシドジスムターゼ活性を調節する方法。

【請求項23】 細胞に配列表の配列番号2に示す塩基配列を有する核酸をスーパーオキシドジスムターゼ活性(SOD1)を調節するのに有効な量、投与することからなる細胞内におけるスーパーオキシドジスムターゼ活性を調節する方法。

【請求項24】 スーパーオキシドジスムターゼ(SO

D1)が変異型であることを特徴とする、請求項22または23に記載の方法。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、神経芽細胞腫において発現する遺伝子に由来する核酸類およびそれらがコードする遺伝子発現産物に関する。さらに詳しくは、本発明は、予後良好な神経芽細胞腫と、予後不良な神経芽細胞腫との比較において、予後良好な神経芽細胞腫で発現が増強されているマーカー遺伝子に由来する核酸およびその断片、並びにそれらの神経芽細胞腫の予後の診断への用途に関する。

##### 【0002】

【従来の技術】個々の腫瘍にはそれぞれの個性があり、発癌の基本的な原理は同じであっても、その生物学的特性は必ずしも同じではない。近年、癌の分子生物学や分子遺伝学が急速に進歩し、発癌やいわゆる腫瘍細胞のバイオロジーが遺伝子レベルで説明できるようになってきた。

【0003】(神経芽細胞腫) 神経芽細胞腫は、末梢交感神経系細胞に由来する交感神経節細胞と副腎髄質細胞に発生する小児癌である。この交感神経系細胞は、発生初期の神経堤細胞が腹側へ遊走し、いわゆる交感神経節が形成される場所で分化成熟したものである。その一部の細胞は、さらに副腎部へ遊走し、先に形成されつつある副腎皮質を貫通して髄質部に達し、そこで髄質を形成する。神経堤細胞は、ほかの末梢神経細胞の起源ともなっており、後根神経節(知覚神経)、皮膚の色素細胞、甲状腺C細胞、肺細胞の一部、腸管神経節細胞などへ分化する。

【0004】(神経芽細胞腫の予後) 神経芽細胞腫は多彩な臨床像を示すことが特徴である(中川原：神経芽腫の発生とその分子機構 小児内科 30, 143, 1998)。例えば、1歳未満で発症する神経芽細胞腫は、非常に予後が良く、大部分が分化や細胞死を起こして自然退縮する。現在、広く実施されている生後6か月時の尿のマススクリーニングで陽性となる神経芽細胞腫の多くは、この自然退縮を起こしやすいものに属する。一方、1歳以上で発症する神経芽細胞腫は、悪性度が高く、多くの場合、治療に抵抗して患児を死に至らしめる。1歳以上の悪性度の高い神経芽細胞腫は、体細胞突然変異(Somatic mutation)が起こり、モノクローナルであるのに対し、自然退縮する神経芽細胞腫では、生殖細胞突然変異(germline mutation)のみの遺伝子変異でとどまっているとの仮説もある。Knudson AG等：Regression of neuroblastoma IV-S: A genetic hypothesis. N Engl J Med 302, 1254 (1980)を参照。

【0005】(神経芽細胞腫の予後を推定する遺伝子) 最近の分子生物学的研究の進展により、神経成長因子(nerve growth factor: NGF)の高親和性レセプターであるTrkAの発現が分化と細胞死の制御に深くかかわっていることが明らかとなってきた。Nakagawara A., The NGF story and neuroblastoma, Med Pediatr Oncol, 31, 113 (1998)を参照。Trkは膜貫通型レセプターでもあり、Trk-A, B, Cの3つが主なものである。これらTrkファミリー・レセプターは、中枢神経および末梢神経系において、特異的な神経細胞の分化と生存維持に重要な役割を果たしている。中川原等：神経芽細胞腫におけるニューロトロフィン受容体の発現と予後 小児外科 29: 425-432, 1997を参照。腫瘍細胞の生存や分化は、TrkチロシンキナーゼやRetチロシンキナーゼからのシグナルで制御されている。なかでも、TrkAレセプターの役割は最も重要で、予後良好な神経芽細胞腫ではTrkAの発現が著しく高く、これからのシグナルが腫瘍細胞の生存・分化、または細胞死(アポトーシス)を強く制御している。一方、予後不良な神経芽細胞腫では、TrkAの発現が著しく抑えられており、これに代わってTrkB或いはRetからのシグナルが生存の促進という形で腫瘍の進展を助長している。

【0006】また、神経の癌遺伝子であるN-mycの増幅が神経芽細胞腫の予後に関連していることも明らかになってきた。中川原：脳・神経腫瘍の多段階発癌, Molecular Medicine, 364, 366 (1999)を参照。この遺伝子は神経芽細胞腫で初めてクローニングされたが、正常細胞や予後良好な神経芽細胞腫では通常1倍体当たり1つしか存在しないのに対し、予後不良の神経芽細胞腫においては数十倍に増幅されているのが見つかった。

【0007】しかしながら、現在までに、神経芽細胞腫に発現されている癌遺伝子は、N-myc以外知られておらず、その予後の良不良に関する遺伝子情報に関しても、N-mycとTrkA以外はほとんど知られていなかった。

##### 【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、かかる事情に鑑みてなされたものであり、神経芽細胞腫の予後の良不良に関係する遺伝子の塩基配列を明らかにし、その遺伝子情報に基づいて、神経芽細胞腫の予後の良不良に関する診断を可能とすることを目的とする。さらに、前記遺伝子の転写産物であるタンパク質の機能に関する情報を提供することを目的とする。

##### 【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者は上記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、神経芽細胞腫の予後を

検定し、予後良好および予後不良の臨床組織サンプルの各々からcDNAライブラリーを作成することに成功した。これら2種類のcDNAライブラリーから各々約2400クローンをクローニングし、神経芽細胞腫の予後の良悪によって分類し、それぞれのサブセットでプロファイリングを行った。

【0010】そこで、本発明者は、前記サブセット間で示差的に発現し、かつ予後の良好な臨床組織サンプルでのみ高発現を示す遺伝子群を見出し、その一つをNEDL-1 (nbla0078) と名付けた。さらに、本発明者はNEDL-1遺伝子の全長をシーケンスし、それがコードするNEDL-1タンパク質の機能解析を行ったところ、HECT型ユビキチンリガーゼであることが判明した。

【0011】かかる知見に基づき、本発明者は、神経芽細胞腫の予後良好な臨床組織でのみ発現が増強している遺伝子を検出およびクローニングするための遺伝子情報(塩基配列情報等)を提供することを可能とした。さらに、前記塩基配列情報に基づき、予後の診断方法およびそのために使用可能な診断剤等を提供することを可能とし、本発明を完成した。

【0012】すなわち、本発明によれば以下の(a)または(b)の核酸を含む核酸プローブが提供される:

(a) 配列表の配列番号2に示す塩基配列の一部、またはそれと相補的な塩基配列を有する核酸;

(b) 配列表の配列番号2に示す塩基配列からなる核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸、またはそれと相補的な塩基配列を有する核酸。

【0013】好ましくは、前記核酸プローブにおいて、核酸がDNAである。

【0014】また好ましくは、上記核酸プローブにおいて、核酸が少なくとも20個の塩基長である。

【0015】さらに好ましくは、上記核酸プローブにおいて、核酸が配列表の配列番号2に示す塩基配列の全長である。

【0016】また、本発明によれば上記の核酸プローブを有効成分とする神経芽細胞腫の予後診断剤が提供される。

【0017】また、本発明によれば以下の(a)または(b)のDNAを含むプライマーが提供される:

(a) 配列表の配列番号2に示す塩基配列の一部、またはそれと相補的な塩基配列を有するDNA;

(b) 配列表の配列番号2に示す塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA、またはそれと相補的な塩基配列を有するDNA。

【0018】また、本発明によれば上記のプライマーを有効成分とする神経芽細胞腫の予後キットが提供される。

【0019】さらに、本発明によれば神経芽細胞腫の臨床組織サンプルから配列表の配列番号2に示す塩基配列

からなる核酸の有無を検出することを特徴とする、神経芽細胞腫の予後の診断方法が提供される。

【0020】また、本発明によれば神経芽細胞腫の臨床組織サンプルから配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列からなるタンパク質の有無を神経芽細胞腫の臨床組織サンプルから検出することを特徴とする、神経芽細胞腫の予後の診断方法が提供される。

【0021】加えて、本発明によれば(a)配列表の配列番号2に示す塩基配列の一部、またはそれと相補的な塩基配列を有する核酸、または(b)配列表の配列番号2に示す塩基配列からなる核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸、またはそれと相補的な塩基配列を有する核酸を神経芽細胞腫の臨床組織サンプルと接触させて、配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列からなるタンパク質の発現およびその量を分析することを特徴とする神経芽細胞腫の予後の診断方法が提供される。

【0022】従って、上記の核酸およびタンパク質は、予後良好な神経芽細胞腫と、予後不良な神経芽細胞腫との比較において、予後良好な神経芽細胞腫でのみ発現が増強されているマーカー遺伝子に由来するものであり、該核酸およびタンパク質の配列に関する情報は神経芽細胞腫の予後の診断を可能にすることを特徴とする。

【0023】さらに、本発明によれば配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列からなるタンパク質を有効成分として含むポリユビキチン化剤が提供される。

【0024】前記ポリユビキチン化剤において、好ましくはユビキチン化される基質がアミロイドβ前駆蛋白(βAPP)、アミロイドβ前駆蛋白細胞内領域(AICD)またはスーパーオキシドジスムターゼ(SOD1)変異体である。

【0025】また、本発明によればアミロイドβ前駆蛋白(βAPP)の調節用組成物であって、配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をアミロイドβ前駆蛋白の細胞内での発現、産生、または形成を調節するのに有効な量、含むことを特徴とする調節用組成物が提供される。

【0026】また、本発明によればアミロイドβ前駆蛋白(βAPP)の調節用組成物であって、配列表の配列番号2に示す塩基配列を有する核酸をアミロイドβ前駆蛋白の細胞内での発現、産生、または形成を調節するのに有効な量含むことを特徴とする調節用組成物が提供される。

【0027】さらに、本発明によれば細胞に配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をアミロイドβ前駆蛋白(βAPP)の細胞内発現、産生、または形成を調節するのに有効な量、投与することからなる細胞内でのアミロイドβ前駆蛋白の発現、産生、または形成を調節する方法が提供される。

【0028】また、本発明によれば細胞に配列表の配列

番号2に示す塩基配列を有する核酸をアミロイドβ前駆蛋白(βAPP)の細胞内発現、産生、または形成を調節するのに有効な量、投与することからなる細胞内でのアミロイドβ前駆蛋白(βAPP)の発現、産生、または形成を調節する方法が提供される。

【0029】また、本発明によればスーパーオキシドジムスターゼ(SOD1)活性の調節用組成物であって、配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をスーパーオキシドジムスターゼ活性を細胞内で調節するのに有効な量、含むことを特徴とする調節用組成物が提供される。

【0030】また、本発明によればスーパーオキシドジムスターゼ(SOD1)活性の調節用組成物であって、配列表の配列番号2に示す塩基配列を有する核酸をスーパーオキシドジムスターゼ活性を細胞内で調節するのに有効な量、含むことを特徴とする調節用組成物が提供される。

【0031】さらに、細胞に配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をスーパーオキシドジムスターゼ(SOD1)活性を調節するのに有効な量、投与することからなる細胞内におけるスーパーオキシドジムスターゼ活性を調節する方法が提供される。

【0032】また、本発明によれば細胞に配列表の配列番号2に示す塩基配列を有する核酸をスーパーオキシドジムスターゼ(SOD1)活性を調節するのに有効な量、投与することからなる細胞内におけるスーパーオキシドジムスターゼ活性を調節する方法が提供される。

【0033】上記スーパーオキシドジムスターゼ(SOD1)活性の調節用組成物および細胞内におけるスーパーオキシドジムスターゼ活性を調節する方法において、好ましくはSOD1がその変異型である。

【0034】

【発明の実施の形態】以下、本発明に係る予後良好な神経芽細胞腫に高発現する遺伝子(以下、「本発明のNEDL-1遺伝子」或いは単に「NEDL-1遺伝子」という)に由来する核酸(以下、「本発明に係る核酸」という)、および該遺伝子がコードするタンパク質(以下、NEDL-1タンパク質という)について本発明の好適な実施の形態を参照して、詳細に説明する。

【0035】本発明に係る核酸は、上述のごとく本発明のNEDL-1遺伝子に由来するものであり、該遺伝子を構成するか或いは該遺伝子からインビボまたはインビトロの過程によって得られる。該核酸の塩基長に特に制限はなく、ここでは前記遺伝子の一部に対応する核酸断片も含めて本発明に係る核酸という。塩基長が短い場合、その核酸は化学的手法で合成することができる。本明細書で使用する「核酸」という用語は、例えばDNAまたはRNA、或いはそれから誘導された活性なDNAまたはRNAであるポリヌクレオチドを指し、好ましくは、DNAまたはRNAを意味する。特に好ましい核酸

は、本明細書中に開示されるヒトcDNA配列と同一か、または相補的な配列を有する。

【0036】また、本明細書で使用する「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」という用語は、2つの核酸(または断片)が、サンプブルックら(Sambrook, J.)の「大腸菌におけるクローン遺伝子の発現(Expression of cloned genes in E. coli)」、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, 9, 47-9, 62および11, 45-11, 61に記載されたハイブリダイゼーション条件下で、相互にハイブリダイズすることを意味する。

【0037】より具体的には、前記「ストリンジェントな条件」とは、約45℃において6.0xSSCでハイブリダイゼーションを行った後に、50℃において2.0xSSCで洗浄することを指す。ストリンジェンシーの選択のため、洗浄工程における塩濃度を、例えば低ストリンジェンシーとしての約2.0xSSC、50℃から、高ストリンジェンシーとしての約0.2xSSC、50℃まで選択すること、ができる。さらに、洗浄工程の温度を低ストリンジェンシー条件の室温、約22℃から、高ストリンジェンシー条件の約65℃まで高くすることもできる。

【0038】また、本明細書で使用する「核酸」という用語は、単離された核酸を指し、これは組換えDNA技術により作成された場合は細胞物質、培養培地を実質的に含有せず、化学合成された場合には前駆体化学物質またはその他の化学物質を実質的に含まない、核酸またはポリヌクレオチドを指す。

【0039】また、本明細書で使用する「予後良好」とは、神経芽細胞腫のうち、腫瘍が局限して存在するか、または退縮や良性の交感神経節細胞腫になった状態を指し、これはN-mycその他の腫瘍マーカー(TrkA、染色体異常等)から判断して、悪性度が低いと医師によって判断される。本発明の好適な実施の形態では、病期1または2、発症年齢が1歳未満、手術後5年以上再発なく生存し、臨床組織中にN-mycの増幅が認められない症例を予後良好としたが、このような特定の例には限定されない。また、本明細書で使用する「予後不良」とは、神経芽細胞腫のうち、腫瘍の進行が認められる状態を指し、これはN-mycその他の公知の腫瘍マーカーから判断して、悪性度が高いと医師によって判断される。本発明の好適な実施の形態では、病期4、発症年齢が1歳以上、手術後3年以内に死亡、臨床組織サンプル中にN-mycの増幅が認められた症例を予後不良としたが、このような特定の例には限定されない。

【0040】神経芽細胞腫は、ヒトでは2種類しか知られていない神経細胞そのものの腫瘍の1つであり、そこ

で発現している遺伝子を解析することは、神経細胞のバイオロジーを理解する上で非常に有用な知見をもたらすものと考えられる。すなわち、脳や末梢神経から、部位特異的な均質な組織を得ることは極めて困難で、事実上不可能である。一方、神経芽細胞腫は、末梢交感神経細胞に由来するほぼ均一な神経細胞集団（腫瘍化してはいるが）から成り、均質に発現している神経関連遺伝子が得られる可能性が高い。また、神経芽細胞腫は癌であるため、神経発生期の未熟な段階で発現している重要な遺伝子が多いことも特徴として挙げられる。

【0041】さらに、神経芽細胞腫は、予後の良好なものと予後の不良なものとの臨床的、生物学的にはっきり区別される。予後良好な神経芽細胞腫の癌細胞は、増殖速度が極めて遅く、ある時点から自然退縮を始めることが特徴である。これまでの知見から、この自然退縮では、神経細胞の分化およびアポトーシス（神経細胞死）が起こっており、正常神経細胞の成熟段階で起こる分化とプログラム細胞死と非常によく似た現象であることが分かってきた。従って、この腫瘍で発現している遺伝子を解析することによって、神経の分化やアポトーシスに

関連した重要な遺伝子情報を入手できる可能性が極めて高い。

【0042】上記の有用な遺伝子情報を入手できる遺伝子であるNEDL-1遺伝子およびそれがコードするNEDL-1タンパク質は、予後良好な神経芽細胞腫の臨床組織に見出されたものであり、かかる遺伝子およびタンパク質は以下のような特徴を有する。

【0043】本発明のNEDL-1遺伝子は全長6200塩基（コード領域4755塩基）を有する遺伝子であり、その塩基配列を配列表の配列番号2に示す。該遺伝子がコードするNEDL-1タンパク質は、1585個のアミノ酸からなり、その全長を配列表の配列番号1に示す。なお、前記塩基配列およびアミノ酸配列は、GeneBank（HYPERLINK <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>）に受理番号AB048365として登録されている。

【0044】本発明者は、NEDL-1遺伝子およびNEDL-1タンパク質の構造・機能解析の結果から、NEDL-1がHECT型ユビキチンリガーゼであることも見出した。HECT型ユビキチンリガーゼ・ファミリーの一員であることが知られているKIAA0322タンパク質（NEDL2）とNEDL-1タンパク質とのホモロジー解析の結果を図1に示す。NEDL-1タンパク質は、HECT型ユビキチンリガーゼの特徴である以下のドメインを有する。すなわち、(1)C末端領域にHECTドメイン（約300アミノ酸）、NEDL-1で1280～1585位；(2)中央部に複数のWWドメイン（約35～40アミノ酸）、NEDL-1で807～841位と998～1030位、NEDL2で806～840位；(3)N末端領域にカルシウム依存的に膜脂質

に結合するC2ドメイン、NEDL-1で185～295位、NEDL2で186～295位である。さらに、NEDL-1タンパク質は、HECT型ユビキチンリガーゼであるNedd4と同程度のユビキチンリガーゼ活性を示すことが分かった。

【0045】タンパク質は、ユビキチン-プロテアソーム系で分解されているので、このシステムは適正な細胞プロセスに必須のものである。簡単には、該システムは分解すべき標的タンパク質にユビキチン分子（Ub）を多数結合させ（ポリユビキチン化またはユビキチン化という）、ユビキチン化されたタンパク質は26Sプロテアソームによって分解される。タンパク質のユビキチン化は、一連の酵素群、すなわちユビキチン活性化酵素（E1）、ユビキチン結合酵素（E2）およびユビキチン連結酵素（ユビキチンリガーゼ）（E3）の触媒作用によって進行することが明らかにされている（例えば総説として、実験医学、田中啓二「ユビキチンとプロテアソーム」18巻、11号、1452～1456頁、2000年（羊土社）を参照）。このうち、ユビキチンリガーゼ（E3）がE2-UbからUbを受け取り、このUbを標的タンパク質（基質）に連結させる。したがって、ユビキチンリガーゼが特定のタンパク質をユビキチン化する特異性に最も関与すると考えられている。

【0046】ユビキチン-プロテアソーム系の異常（ユビキチン代謝異常）は、多くの疾患と関連していることが指摘されてきた（R. J. Mayerら、Biochem. Biophys. Acta 1089: 141-157（1991））。最近、神経変性疾患とユビキチン代謝異常の関係が注目されてきており、ユビキチンリガーゼとして知られているE6-APがアンジェルマン症候群の責任遺伝子の1つであることが報告されている（実験医学、本多慶臣ら「HECT型ユビキチン連結酵素：生理機能と病態」18巻、11号、1483～1490頁、2000年（羊土社））。したがって、HECT型ユビキチンリガーゼの一種である本発明のNEDL-1タンパク質も神経組織に高発現されることから、神経変性疾患の原因遺伝子産物を基質とすることが充分予想される。それらの原因遺伝子産物は、アルツハイマー病におけるアミロイドβ前駆蛋白（βAPP）およびプレセリニンタンパク質（PS）等が考えられる。

【0047】実際、後述の実施例に記載されているように、NEDL-1がアミロイド前駆蛋白のコード領域であるアミロイドβ前駆蛋白細胞内領域（AICD-amyloidbeta precursor intracellular domain）と相互作用することが見出された。この相互作用は、さらにNEDL-1がβAPPおよびAICDをユビキチン化することによるものであることが確かめられた。

【0048】アミロイドは、アルツハイマー病患者の脳血管や老人斑に異常なレベルで沈着する蛋白であるが、これは主に分子量4kDaのβ蛋白から構成されており、



アミロイド前駆蛋白がセクレターゼで切り出されることで産生される。NEDL-1とAICDが直接相互作用するという事実は、NEDL-1が $\beta$ APP（さらに $\beta$ -アミロイド）の産生を直接或いは間接的に制御している可能性があり、 $\beta$ -アミロイドの産生低下を分子標的としたアルツハイマー病治療戦略を考慮する上で極めて重要な知見となる。

【0049】また、後述の実施例に記載されているように、NEDL-1はスーパーオキシドジスムターゼ(SOD1)変異体と相互作用することが見出された。これは、さらにNEDL-1がSOD1変異体をユビキチン

10 化することによるものであることが確かめられた。  
【0050】筋萎縮性側索硬化症(ALS)は、運動ニューロンの変性・脱落により筋萎縮を生じる、予後不良の神経変性疾患である。現在、家族性のALSは、ALS全体の5~10%の頻度で認められるが、その一部の家系でその原因遺伝子が、Cu/Znスーパーオキシドジスムターゼ(SOD1)遺伝子であることが判明している。SOD1は、好気性代謝の過程で細胞内に生じる活性酸素の一種であるスーパーオキシドを不活化する酵素であり、この低下により、神経細胞が変性する可能性はあるものの、その機序の詳細は不明である。その他の一般的な筋萎縮性側索硬化症についても、原因は不明である。

【0051】現在、ウイルス説、中毒説、神経栄養因子の欠乏説、自己免疫性説、グルタミン酸過剰説、フリーラジカル説などが考えられているがALSで、運動神経のみが変性する病理機序については、まだ決定的なものは判明していない。近年、変異SOD1が細胞内で凝集体を形成し、細胞毒性を発揮するという凝集体仮説が最も有力なものと考えられている。

【0052】現在SOD1の変異体は約80個報告されているが、これら変異体のいずれも細胞内の情報伝達経路は不明なままである。変異SOD1 2種(G85R/G93A)については相互作用分子の報告があり、これらの変異体とのみ結合し、正常SOD1とは結合しない蛋白因子としては、lysyl-tRNA synthetaseとtranslocan-associated protein deltaの2種類のみが判明しているだけであり(Kunst CB, Mezey E, Brownstein MJ, Patterson D. Mutations in SOD1 associated with amyotrophic lateral sclerosis cause novel protein interactions. Nat Genet. 1997 Jan;15(1):91-4.)、その詳細は未だ解明されていない。このようにALSが初めて報告されてから約130年経過する現在でも変異SOD1が新たに獲得するとされる細胞毒性の細胞内情報伝達経路の解明は行き詰まりともいえる状況である。以上の現況を考慮すると本発明で得られた結果は、未だ解明されていないALSの発症メカニズムの解明に極めて重要な知見を提供しているといえる。

【0053】NEDL-1タンパク質は、配列表の配列

番号1に示すアミノ酸配列を有するが、本発明は、配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質をも包含する。

【0054】また、本発明にはNEDL-1タンパク質等の塩も包含される。このような塩としては特に制限はないが、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩、リチウム塩、アンモニウム塩が好ましい。

【0055】また、多くのタンパク質には糖鎖が付加され、アミノ酸を1若しくは複数変換することにより糖鎖の付加を調節することができる。従って、配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列において、前記糖鎖の付加を調節されたタンパク質も本発明に包含される。

【0056】また、NEDL-1タンパク質をコードする塩基配列を有する核酸も本発明に含まれる。ここで、「タンパク質をコードする」とは、DNAが2本鎖である場合には、相補2本鎖のいずれか一方がタンパク質をコードする塩基配列を有することを意味するため、本発明に係る核酸には配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列を直接コードする塩基配列からなる核酸、若しくはその相補的な塩基配列からなる核酸をも包含される。

【0057】さらに、本発明に係る核酸は、配列番号2に示す塩基配列を有する核酸とストリンジントな条件下でハイブリダイズする核酸であってもよく、この条件を満たす限りにおいてはその塩基配列は特に制限されない。さらに、本発明の核酸には前記ストリンジントな条件下でハイブリダイズする核酸に相補的な塩基配列を有する核酸も包含され、具体的には、例えば、配列番号2に示す塩基配列を有する核酸または前記核酸に相補的な塩基配列を有する核酸の塩基のいくつかに欠失、置換、挿入、付加がある核酸が挙げられる。ここで、欠失、置換、挿入、付加とは、1~10塩基の短い欠失、置換、挿入、付加のみならず、10~100塩基の長い欠失、置換、挿入、付加も含む。

【0058】神経芽細胞腫の予後良好なものと、不良なものとの臨床組織サンプルにおける本発明のNEDL-1遺伝子の発現量を比較した結果、顕著な差が認められた。すなわち、この遺伝子は、予後良好な神経芽細胞腫で発現が増強されていた。したがって、配列番号2に示す塩基配列は、上記の様々な有用な遺伝子情報以外に、その配列を有する核酸(DNAまたはRNA)を検出することによって神経芽細胞腫の良不良を診断する腫瘍マーカーの情報として利用可能である。また、配列番号1に示すアミノ酸配列も、その配列情報に基づいて本発明のNEDL-1タンパク質を検出することによって神経芽細胞腫の良不良を診断する腫瘍マーカーの情報として利用可能である。

【0059】すなわち、本発明は、本発明のNEDL-1遺伝子およびNEDL-1タンパク質を用いて、神経芽細胞腫およびそれに関連する様々な遺伝子情報を以下



の手段により得ることを可能とする。

【0060】(1) ハイブリダイゼーションに用いるプローブ

本発明の1つの実施の形態に従えば、本発明に係る核酸をハイブリダイゼーションのプローブ(すなわち、本発明の核酸プローブ)として使用することによって、神経芽細胞腫で発現している本発明のNEDL-1遺伝子を検出することが可能である。さらに、本発明に係る核酸をハイブリダイゼーションのプローブとして使用し、様々な腫瘍、正常組織における遺伝子発現を調べることに

よって、該遺伝子発現の分布を同定することも可能である。

【0061】本発明に係る核酸をハイブリダイゼーションのプローブとして使用する場合、ハイブリダイゼーション法自身については、特に限定はない。好適な方法として、例えば、ノザンハイブリダイゼーション、サザンハイブリダイゼーション、コロニーハイブリダイゼーション、ドットハイブリダイゼーション、Fluorescence in situ hybridization (FISH)、in situ hybridization (ISH)、DNAチップ法、マイクロアレイ法等が挙げられる。

【0062】前記ハイブリダイゼーションの1つの応用例として、本発明に係る核酸をノザンハイブリダイゼーションのプローブとして用い、検定したい臨床組織サンプル中においてmRNAの長さを測定することや、本発明のNEDL-1遺伝子発現を定量的に検出することが可能である。

【0063】また別の応用例として、本発明に係る核酸をサザンハイブリダイゼーションのプローブとして用い、検定したい臨床組織サンプルのゲノムDNA中、該DNA配列の有無を検出することが可能である。

【0064】さらに別の応用例として、本発明に係る核酸をFISH法のプローブとして用い、本発明のNEDL-1遺伝子の染色体上の位置を同定することも可能である。

【0065】さらに別の応用例として、本発明に係る核酸をISH法のプローブとして用い、本発明のNEDL-1遺伝子の発現の組織分布を同定することも可能である。

【0066】本発明に係る核酸をハイブリダイゼーション用プローブとして使用する場合、少なくとも20個の塩基長が必要であり、本発明に係る核酸のうち、20個以上の連続した塩基からなる核酸が好ましく用いられる。より好ましくは、40個以上の連続した塩基からなる核酸が用いられる。特に好ましくは、60個以上の連続した塩基からなる核酸が用いられる。さらに、配列番号2に示す塩基配列の全長からなる核酸を用いてもよい。

【0067】当業者にとって、上記各種のハイブリダイ

ゼーションにおける核酸プローブ技法は周知であり、例えば、個々の長さの本発明の核酸プローブと、目的とするポリヌクレオチドとの適当なハイブリダイズ条件は容易に決定することができる。種々の長さを含むプローブに対し至適なハイブリダイズ条件を得るためのかかる操作は、当業者では周知であり、例えばサンプルブックら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (前掲)を参照して、行えばよい。

【0068】好ましくは、本発明の核酸プローブは、容易に検出されるように標識される。検出可能な標識は、目視によって、または機器を用いるかのいずれかによって検出され得るいかなる種類、元素または化合物であってもよい。通常使用される検出可能な標識としては、放射性同位元素、アビジンまたはビオチン、蛍光物質(FITCまたはローダミン等)が挙げられる。前記放射性同位元素は、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{35}\text{S}$ 等である。また、ビオチン標識ヌクレオチドは、ニックトランスレーション、化学的または酵素的手段によって、核酸に組み込むことができる。ビオチン標識されたプローブは、アビジン/ストレプトアビジン、蛍光標識、酵素、金コロイド複合体等などの標識手段を使用したハイブリダイゼーションの後検出される。また、本発明の核酸プローブは、タンパク質と結合させることによって標識されてもよい。その目的で、例えば放射性または蛍光ヒストン一本鎖結合タンパク質が使用される。このようにして、適当に標識されたプローブは、本発明の予後診断剤を構成する。

【0069】(2) PCRに用いるプライマー

本発明のNEDL-1遺伝子を検出するには上記のハイブリダイゼーション法の他に、本発明に係る核酸に含まれる任意の核酸(DNA)配列からプライマーを設計して、Polymerase Chain Reaction (PCR)法を用いることにより可能である。例えば、検定したい臨床組織サンプルからmRNAを抽出し、RT-PCR法により遺伝子発現を半定量的に測定することが可能である。このような方法は、当業者にとって周知の方法に従って行われるが、例えば、サンプルブックら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (前掲)、および遺伝子病入門(高久史磨著:南江堂)が参照される。

【0070】本発明に係る核酸(DNA)をPCR用プライマー(すなわち、本発明のプライマー)として使用する場合、10ないし60個の塩基長が必要であり、本発明に係る塩基配列の一部であって、10ないし60個の連続した塩基を有する核酸が好ましく用いられる。より好ましくは、15ないし30個の塩基を有するものが用いられる。また一般的には、プライマー配列中のGC含量が40ないし60%のものが好ましい。さらに、増幅に用いる2つのプライマー間の $T_m$ 値に差がないこと

が望まれる。また、プライマーの3'末端でアニールせず、プライマー内で2次構造をとらないことも望ましい。

#### 【0071】(3) 遺伝子のスクリーニング

本発明に係る核酸を使用することによって、様々な組織や細胞で発現している本発明のNEDL-1遺伝子の発現分布を検出することが可能である。これは例えば、本発明に係る核酸を上記のようにハイブリダイゼーションのプロープ、またはPCRのプライマーとして使用することによって、可能となる。

【0072】また、DNAチップ、マイクロアレイ等を用いても遺伝子の発現分布を検出することが可能である。すなわち、本発明に係る核酸を直接、前記チップ、アレイ上に張り付けことが出来る。そこに臨床組織サンプルから抽出したmRNAを蛍光物質などで標識し、ハイブリダイズさせ、その遺伝子がどの様な組織の細胞で高発現しているかを解析することが可能である。またチップ、アレイ上に張り付けるDNAは、本発明に係る核酸をプロープとして用いたPCRの反応産物であってもよい。

#### 【0073】(4) 腫瘍の予後診断の方法およびそのために使用可能な腫瘍マーカー

上述のように本発明のNEDL-1遺伝子は、予後良好な神経芽細胞腫で発現が増強されていた。そこで、本発明に係る核酸をハイブリダイゼーションのプロープ或いはPCRのプライマーとして使用し、被験者から採取した、臨床組織を含むサンプル中で、前記遺伝子の発現の増強の有無を調べることで予後診断が行える。遺伝子の検出方法としては、前述のノーザンブロットハイブリダイゼーション法、インサイチュハイブリダイゼーション法、およびRT-PCR法等が挙げられる。

【0074】ハイブリダイゼーション法を用いるとき、サンプル中で前記核酸プロープとハイブリダイズする核酸の量が増強する場合、予後が良好であると診断できる。また、RT-PCR法を用いるとき、サンプルからmRNAを抽出し、これをDNAに逆転写して、前記プライマーにより増幅するRT-PCR法を用いて、遺伝子発現を半定量的に測定する。このようにして遺伝子発現の増強が認められる場合、予後が良好であると診断できる。この特定の診断目的のためには、該プライマーを必須成分として一組合有する診断用キットを用いることが好ましい。該診断用キットは、プライマー成分以外に、PCR用の緩衝液、洗浄液、および酵素等の公知の成分を含む。

#### 【0075】(6) アンチセンスオリゴヌクレオチド

本発明の別の実施の形態に従えば、本発明に係る核酸に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドが提供される。前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、本発明に係る核酸にハイブリダイズすることが可能であり、アンチセンスDNAとアンチセンスRNAとを含む。アンチセン

スDNAは、DNAからmRNAへの転写を阻害し、アンチセンスRNAは、mRNAの翻訳を阻害する。このようなアンチセンスオリゴヌクレオチドは、自動合成機を使用して、または本発明に係る核酸を鋳型とするPCR法により合成できる。さらに、該アンチセンスオリゴヌクレオチドは、DNAやmRNAとの結合力、組織選択性、細胞透過性、ヌクレアーゼ耐性、細胞内安定性が高められたアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体をも包含する。このような誘導体は、公知のアンチセンス技術を用いて、合成することができる。

【0076】mRNAの翻訳開始コドン付近、リボソーム結合部位、キャッピング部位、スプライス部位の配列に相補的な配列を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、該RNAの合成を阻止することができ、特に遺伝子の発現抑制効果が高い。従って、本発明は、かかるアンチセンスオリゴヌクレオチドを好適に包含する。

#### 【0077】(6) 遺伝子治療

本発明の別の実施の形態に従えば、遺伝子治療に用いられる治療用遺伝子をコードする核酸配列が提供される。そこで、本発明に係る核酸を遺伝子運搬に使用されるベクターに導入して、任意の発現プロモーターにより導入遺伝子(本発明のNEDL-1遺伝子)を発現させ、例えば神経変性疾患の遺伝子治療に用いることができる。

#### 【0078】1. ベクター

導入されうるウイルスベクターは、DNAまたはRNAウイルスをもとに作製できる。このようなベクターは、MoMLVベクター、ヘルペスウイルスベクター、アデノウイルスベクター、AAVベクター、HIVベクター、SIVベクター、センダイウイルスベクター等のいかなるウイルスベクターであってもよい。また、ウイルスベクターの構成タンパク質群のうち1つ以上を、異種ウイルスの構成タンパク質に置換する、もしくは、遺伝子情報を構成する核酸配列のうち一部を異種ウイルスの核酸配列に置換する、シュドタイプ型のウイルスベクターも本発明に使用できる。例えば、HIVの外皮タンパク質であるEnvタンパク質を、小水痘性口内炎ウイルス(Vesicular stomatitis virus: VSV)の外皮タンパク質であるVSV-Gタンパク質に置換したシュドタイプウイルスベクターが挙げられる[Naldini L等: Science 272 263-(1996)]。さらに、治療効果を持つウイルスであれば、ヒト以外の宿主域を持つウイルスもウイルスベクターとして使用可能である。ウイルス以外のベクターとしてはリン酸カルシウムと核酸の複合体、リボソーム、カチオン脂質複合体、センダイウイルスリボソーム、ポリカチオンを主鎖とする高分子キャリア等が使用可能である。さらに遺伝子導入系としてはエレクトロポレーション、遺伝子銃等も使用可能である。

#### 【0079】2. 発現プロモーター

さらに、治療用遺伝子に用いられる発現カセットは、標的細胞内で遺伝子を発現させることができるものであれば、特に制限されることなくいかなるものでも用いることができる。当業者はそのような発現カセットを容易に選択することができる。好ましくは、動物由来の細胞内で遺伝子発現が可能な発現カセットであり、より好ましくは、哺乳類由来の細胞内で遺伝子発現が可能な発現カセットであり、特に好ましくは、ヒト由来の細胞内で遺伝子発現が可能な発現カセットである。発現カセットに用いられる遺伝子プロモーターは、例えばアデノウイルス、サイトメガロウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、シミアンウイルス40、ラウス肉腫ウイルス、単純ヘルペスウイルス、マウス白血病ウイルス、シンビスウイルス、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、パピローマウイルス、ヒトT細胞白血病ウイルス、インフルエンザウイルス、日本脳炎ウイルス、JCウイルス、パルボウイルスB19、ポリオウイルス等のウイルス由来のプロモーター、アルブミン、SR $\alpha$ 、熱ショック蛋白、エロンゲーション因子等の哺乳類由来のプロモーター、CAGプロモーター等のキメラ型プロモーター、テトラサイクリン、ステロイド等によって発現が誘導されるプロモーターを含む。

#### 【0080】(7) 医薬品

本発明の別の実施の形態として、医薬品に用いられる治療用タンパク質及びペプチドが提供される。本発明を実施する際に考慮されるように、本発明のNEDL-1タンパク質およびその一部であるペプチドを任意の調製法にて調製し、任意の投与方法、投与量にて用いることで、例えば各種悪性腫瘍、或いは神経変性疾患（例えば、アルツハイマー病）の治療に用いることができる。

#### 【0081】1. 調製法

医薬品は、例えば上記に示すような治療用にデザインされた薬物遺伝子を含む組換えウイルスベクターとして調製される。より具体的に言えば、NEDL-1遺伝子を含む組換えウイルスベクターを、水、生理食塩水、等強化した緩衝液等の適当な溶媒に溶解することで調製できる。また任意に製造されたNEDL-1タンパク質を同様に水、生理食塩水、等強化した緩衝液等の適当な溶媒に溶解することで調製することも可能である。その際、ポリエチレングリコール、グルコース、各種アミノ酸、コラーゲン、アルブミン等を保護材として添加しても調製可能である。

#### 【0082】2. 投与方法、投与量

上記医薬品の生体への投与方法については特に制限はない。例えば非経口的投与、例えば注射投与することにより好ましく実施できる。その医薬品の使用量は、その使用方法、使用目的等により異なり、当業者は容易に適宜選択最適化することが可能である。例えば、注射投与

して用いる場合には、1日量約0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ~ 1000  $\text{mg}/\text{kg}$  を投与するのが好ましく、より好ましくは、1日量約1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ~ 1000  $\text{mg}/\text{kg}$  である。

#### 【0083】(8) 抗体、アンチセンス、リボザイム、TFO

本発明のさらに別の実施の形態として、本発明のNEDL-1タンパク質のユビキチンリガーゼ活性を抑制する抗体、及び本発明のNEDL-1遺伝子の発現を抑制するアンチセンス、リボザイム、TFO等の塩基配列が提供される。本発明を実施する際に考慮されるように、これらのアンチセンス、リボザイム、TFOをコードする核酸を遺伝子運搬に使用されるベクターに導入して、任意の発現プロモーターにより導入遺伝子を発現させ、例えば初代培養細胞の株化や癌のモデル動物作製に用いることができる。

#### 【0084】(9) 遺伝子改変動物

本発明のさらに別の実施の形態として、本発明のNEDL-1遺伝子の発現をノックアウトする核酸配列、及びノックアウト動物（ノックアウトマウス等）が提供される。また、前記遺伝子を強制発現したトランスジェニック動物（トランスジェニックマウス等）、遺伝子に点変異や欠失等の任意の変異を導入した変異遺伝子が導入された遺伝子改変動物等が提供される。このような遺伝子改変動物は、例えば神経変性疾患のモデル動物作製に用いることができる。

【0085】以上説明したように、本発明のNEDL-1遺伝子またはタンパク質若しくはこれらから得られる情報を利用することにより、臨床組織サンプルから該NEDL-1遺伝子を検出することが可能となり、神経芽細胞腫の予後の良悪の診断が可能となる。また、前記遺伝子若しくはタンパク質、またはこれらから得られる情報を利用することにより、予後の診断方法および前記方法に使用可能な腫瘍マーカーを設計することが可能となる。

【0086】以下、実施例に即してさらに詳しく説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例に限定されるものではない。

#### 【0087】

#### 【実施例】（製造例1）神経芽細胞腫からのcDNAライブラリーの構築

##### 1. 試料入手

神経芽細胞腫の臨床組織サンプルを手術摘出直後に準無菌的に凍結し、その後-80℃に保存した。

##### 【0088】2. 予後良好な試料の選別

1で得られた試料について予後の検定を以下の指標をもとに行った。

#### 【0089】

予後良好：

・ 病期1または2

予後不良：

・ 病期4

- ・発症年齢が1歳未満
- ・手術後5年以上再発なく生存
- ・N-mycの増幅なし

上記2つの試料において、N-myc増幅は下記のようにして確認した。

【0090】上記1で得られたサンプルを剃刀で細かく切断し、5mlのTENバッファー(50mM Tris-HCl (pH=8.0)/1mM EDTA/100mM NaCl)を加えよくホモジナイズした。この混合液に750μlのSDS(10%)、125μlのproteinase K(20mg/ml)を加え、軽く混和し、50℃で8時間放置した。その後、フェノール・クロロホルム処理を行い、最後にエタノール沈殿により、ゲノムDNAを精製した。5μgの得られたゲノムDNAを制限酵素EcoRI(NEB社製)で完全に消化し、N-mycのプロンプを用いてサザンハイブリダイゼーションによりN-myc増幅を調べた。

【0091】3. 予後良好な神経芽細胞腫の臨床組織からmRNAの調製

上記2において予後良好であると判定された神経芽細胞腫の臨床組織サンプル2~3gをTotal RNA Extraction Kit(QIGEN社製)を用いて処理し、トータルRNAを抽出した。抽出したトータルRNAを、オリゴdTセルロースカラム(Coillaborative社製)を用いて、polyA構造を有するmRNAのプールを精製した。

【0092】4. mRNAの脱リン酸化

上記3において調製した100~200μgのmRNAのプールを67.3μlの0.1%ジエチルピロカーボネート(DEPC)を含む蒸留滅菌水に溶解させ、20μlの5x BAPバッファー[Tris-HCl(500mM, pH=7.0)/メルカプトエタノール(50mM)]、2.7μlのRNasin(40unit/μl: Promega社製)、10μlのBAP(0.25unit/μl、バクテリア由来アルカリフォスファターゼ: 宝酒造社製)を加えた。この混合液を37℃で1時間反応させ、mRNAの5'末端の脱リン酸化処理を行った。その後、フェノール・クロロホルム処理を2回行い、最後にエタノール沈殿により、脱リン酸化mRNAのプールを精製した。

【0093】5. 脱リン酸化mRNAの脱キャップ処理

上記4において調製した脱リン酸化mRNAのプールの全量を75.3μlの0.1%DEPCを含む蒸留滅菌水に溶解させ、20μlの5x TAPバッファー[酢酸ナトリウム(250mM, pH=5.5)/メルカプトエタノール(50mM)、EDTA(5mM, pH=8.0)]、2.7μlのRNasin(40unit/μl)、2μlのTAP(Tobacco Acid pyrophosphatase: 20unit/μl)]を加えた。この混合液を37℃で1時間反応さ

- ・発症年齢が1歳以上
- ・手術後3年以内に死亡
- ・N-myc増幅あり

せ、脱リン酸化mRNAの5'末端の脱キャップ処理を行った。この際、キャップ構造を持たない不完全長の脱リン酸化mRNAは脱キャップ処理されず5'末端は脱リン酸化された状態に留まる。その後、フェノール・クロロホルム処理、エタノール沈殿により、脱キャップmRNAのプールを精製した。

【0094】6. オリゴキャップmRNAの調製

上記5において調製した脱キャップmRNAのプールの全量を11μlの0.1%DEPCを含む蒸留滅菌水に溶解させ、4μlの5'-オリゴRNA(5'-AGCAUCGAGUCGGCCUUGGCCUACUGG-3': 100ng/μl)、10μlの10x ligationバッファー[Tris-HCl(500mM, pH=7.0)/メルカプトエタノール(100mM)]、10μlの塩化マグネシウム(50mM)、2.5μlのATP(24mM)、2.5μlのRNasin(40unit/μl)、10μlのT4 RNA ligase(25unit/μl: 宝酒造社製)、50μlのポリエチレングリコール(50%w/v、PEG8000: シグマ社製)を加えた。この混合液を20℃で3時間反応させ、脱キャップmRNAの5'末端に5'-オリゴRNAを連結した。この際、キャップ構造を持たない不完全長の脱リン酸化mRNAは、5'-オリゴRNAが連結されない。その後、フェノール・クロロホルム処理、エタノール沈殿により、オリゴキャップmRNAのプールを精製した。

【0095】7. オリゴキャップmRNAからのDNA除去

上記6において調製したオリゴキャップmRNAのプールを70.3μlの0.1%DEPCを含む蒸留滅菌水に溶解させ、4μlのTris-HCl(1M, pH=7.0)、5.0μlのDTT(0.1M)、16μlの塩化マグネシウム(50mM)、2.7μlのRNasin(40unit/μl)、2μlのDNase I(5unit/μl: 宝酒造社製)を加えた。この混合液を37℃で10分間反応させ、余分なDNAを分解した。その後、フェノール・クロロホルム処理、エタノール沈殿、カラム精製(S-400HR: ファルマシアバイオテック社製)により、DNA(-)オリゴキャップmRNAのプールを精製した。

【0096】8. 1st strand cDNAの調製

上記7において調製したDNA(-)オリゴキャップmRNAのプールをSuper Script II(ライフテックオリエンタル社製キット)を用いて逆転写し、1st strand cDNAのプールを得た。DNA(-)オリゴキャップmRNAのプールを21μ

1の滅菌蒸留水に溶解させ、10 $\mu$ lの10x First Strandバッファ（キット付属品）、8 $\mu$ lのdNTPmix（5mM、キット付属品）、6 $\mu$ lのDTT（0.1M、キット付属品）、2.5 $\mu$ lのオリゴdTアダプタープライマー（5pmol/ $\mu$ l、5'-GCGGCTGAAGACGGCCTATGTGGCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'）、2.0 $\mu$ lのRNasin（40unit/ $\mu$ l）、2 $\mu$ lのSuper Script II RTase（キット付属品）を加えた。この混合液を42℃で3時間反応させ、逆転写反応を行った。その後、フェノール・クロロホルム処理、アルカリ処理、中和処理にて全てのRNAを分解し、エタノール沈殿で精製した。

#### 【0097】9. 2nd strand cDNAの調製

上記8において調製した1st strand cDNAのプールをGeneAmp（パーキンエルマー社製キット）を用いて、PCR増幅を行った。1st strand cDNAのプールを52.4 $\mu$ lの滅菌蒸留水に溶解させ、30 $\mu$ lの3xReactionバッファ（キット付属品）、8 $\mu$ lのdNTP mix（2.5mM、キット付属品）、4.4 $\mu$ lの酢酸マグネシウム（25mM、キット付属品）、1.6 $\mu$ lのプライマーF（10pmol/ $\mu$ l、5'-AGCATCGAGTCGGCCTTGTG-3'）、1.6 $\mu$ lのプライマーR（10pmol/ $\mu$ l、5'-GCGCTGAAGACGGCCTATGT-3'）、2 $\mu$ lのrTth（キット付属品）を加えた。この混合液に、100 $\mu$ lのミネラルオイルを静かに加え重層した。この反応液を94℃で5分間変性させた後、94℃、1分間、52℃、1分間、72℃、10分間を1サイクルとして12サイクル繰り返し、さらに72℃で10分間放置しPCR反応を行った。その後、フェノール・クロロホルム処理、エタノール沈殿で精製し、2nd strand cDNAのプールを得た。

#### 【0098】10. 2nd strand cDNAのSfiI処理

上記9において調製した2nd strand cDNAのプールを87 $\mu$ lの滅菌蒸留水に溶解させ、10x NEBバッファ（NEB社製）、100xBSA（ウシ血清アルブミン、NEB社製）、2 $\mu$ lのSfiI（制限酵素、20unit/ $\mu$ l、NEB社製）を加えた。この混合液を50℃で一晩反応させ、SfiIによる制限酵素処理を行った。その後、フェノール・クロロホルム処理、エタノール沈殿で精製し、両末端がSfiI処理されたcDNAのプールを得た。

#### 【0099】11. SfiI処理されたcDNAのサイズ分画

上記10において調製したSfiI処理されたcDNAのプールを1%のアガロースゲルで電気泳動し、2kb

以上の分画をGene clean II（Bio 101社製）を用いて精製した。精製したcDNAのプールは100 $\mu$ lの滅菌蒸留水に溶解させ、37℃で6時間放置した。その後、フェノール・クロロホルム処理、エタノール沈殿で精製し、長鎖cDNAのプールを得た。

#### 【0100】12. cDNAライブラリー

上記11において調製した長鎖cDNAのプールをDNA Ligationkit ver. 1（宝酒造社製キット）を用いてクローニングベクターであるpME18S-FL3（東京大学医科学研究所 菅野純夫教授より供与）にライゲーションを行った。長鎖cDNAのプールを8 $\mu$ lの滅菌蒸留水に溶解させ、あらかじめ制限酵素DraIIIで処理された1 $\mu$ lのpME18S-FL3、80 $\mu$ lのSolution A（キット付属品）、10 $\mu$ lのSolution B（キット付属品）を加え、16℃で3時間反応させた。その後、フェノール・クロロホルム処理、エタノール沈殿で精製しcDNAライブラリーを得た。

#### 【0101】（実施例1）大腸菌へのトランスフォーメーション

##### 1. クローニング

実施例1の12で調製したcDNAライブラリーを大腸菌（TOP-10、Invitrogen社製）にトランスフォーメーションした。cDNAライブラリーを10 $\mu$ lの滅菌蒸留水に溶解し、TOP-10に混合した。その後、氷上にて30分間、40℃で1分間、氷上で5分間インキュベートした。500 $\mu$ lのSOB培地を加え、37℃で60分間振盪培養した。アンピシリンを含む寒天培地上に適量ずつ播種し、37℃で一昼夜培養して、大腸菌クローンを得た。

#### 【0102】2. 大腸菌クロンの保存（グリセロールストックの調製）

上記1において得られた寒天培地上の大腸菌クローンを、爪楊枝にて拾い上げ、96穴プレートに準備した120 $\mu$ lのLB培地中に懸濁させた。この96穴プレートを37℃で一晩静置し、大腸菌の培養を行った。その後60%グリセロール溶液を72 $\mu$ l加え、-20℃で保存した（グリセロールストック）。

#### 【0103】（実施例2）塩基配列決定

##### 1. プラスミドの調製

実施例1の2で調製した10 $\mu$ lのグリセロールストックを15mlの遠心チューブに移し、3mlのLB培地、50 $\mu$ g/mlのアンピシリンを加え、37℃で一晩振盪し、大腸菌の培養を行った。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN社製）を用いて大腸菌からプラスミドDNAを抽出、精製した。

#### 【0104】2. 両末端シーケンスの解析

上記1において調製したプラスミドDNAをDNA S

sequencing Kit (ABI社製キット)を用いて両末端のシーケンスを決定した。600 ngのプラスミドDNA、8 μlのプレミックス(キット付属品)、3.2 pmolのプライマーを混合し、滅菌蒸留水で合計20 μlになるように調製した。この混合液を96℃2分間変性させた後、96℃、10秒間、50℃、5秒間、60℃、4分間を1サイクルとして25サイクル繰り返し反応を行った。その後エタノール沈殿で精製した。変性条件下でポリアクリルアミドゲルにて電気泳動を行い、ABI 377 (ABI社製)を用いて配列決定を行った。

【0105】(実施例3) データベースを用いたホモロジー検索

実施例2において両末端シーケンスを解析して得られたサンプルの塩基配列情報についてインターネットを介したDNA配列のホモロジー検索を行った。検索にはNCBI (National Center of Biotechnology Information USA, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)のBLASTを用いた。ホモロジー検索の結果、cDNAサンプルの一つであるnb1a0078はヒト9番染色体上のゲノムシーケンス(GenBank 受理番号AL161625)と高い相同性を示した。

【0106】(実施例4) nb1a0078の全長クローニング

実施例3で得られたゲノム配列について、遺伝子転写配列をGENESCAN (Burge C等: 1997、1998)およびGENESH (Salamov A等: 1999)を用いて予測した。予測された配列をもとにnb1a0078の全長を以下の方法でクローニングした。

【0107】すなわち、予後良好な神経芽細胞腫臨床組織サンプルから抽出した15 μgのトータルRNAをSuperscript II reverse transcriptase (GIBCO社製)を用いてcDNAに逆転写した。逆転写した2 μlのcDNAに5 μlの滅菌蒸留水、1 μlの10× rTaqバッファー(宝酒造社製)、1 μlの2mM dNTPs、各々0.5 μlの合成プライマーセット、0.5 μlのrTaq (宝酒造社製)を混合した。この混合液を95℃で2分間変性させた後、95℃、15秒間、58℃、15秒間、72℃、20秒間を1サイクルとして35サイクル繰り返し、さらに72℃で20分間放置しPCR反応を行った。PCRで増幅したバンドをpGEM-T easy vector (Promega社製)にサブクローニングし、一般的手法(Sanger F.等: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467, (1977))を用いて塩基配列を決定した。解析にはABI 377 (ABI社製)を用

いた。塩基配列は全て両鎖とも解析した。

【0108】得られたNEDL-1遺伝子配列をDDBJ、GenBank、EMBLに登録した。受理番号はAB048365である。

【0109】(実施例5) 半定量的RT-PCRによる予後良好・不良神経芽細胞腫でのNEDL-1遺伝子発現の比較

全ての半定量的RT-PCRは以下の方法により実施した。

【0110】1. 逆転写(RT)反応

抽出した5 μgのトータルRNAをSuperscript II reverse transcriptase (GIBCO社製)を用いてcDNAに逆転写した。

【0111】2. PCR反応

PCR反応はrTaq (宝酒造社製)を用いて行った。逆転写した2 μlのcDNA、5 μlの滅菌蒸留水、1 μlの10× rTaqバッファー、1 μlの2mM dNTPs、各々0.5 μlの合成プライマーセット、0.5 μlのrTaqを混合した。この混合液を95℃で2分間変性させた後、95℃、15秒間、58℃、15秒間、72℃、20秒間を1サイクルとして35サイクル繰り返し、さらに72℃で20分間放置しPCR反応を行った。

【0112】また陽性対照としてGAPDHを用いた。

プライマーを以下に示す

FW: 5' CTGCACCAACAATATCCC3'

(配列番号3)

RV: 5' GTAGAGACAGGGTTTTCAC3'

(配列番号4)

3. NEDL-1遺伝子発現の比較

実施例3で得られた予後良好・不良神経芽細胞腫のトータルRNAについて、上記の条件でRT-PCR反応を行った。この反応液を2.5%のアガロースゲルで電気泳動した。この結果、NEDL-1遺伝子の発現が予後良好な神経芽細胞腫臨床組織に特異的であることが確認された。結果を図2に示す。なお、図2中、各レーンのサンプルは以下のとおりである。

【0113】レーンF1~16(左側): 予後良好な神経芽細胞腫臨床組織サンプル

レーンUF1~16(右側): 予後不良な神経芽細胞腫臨床組織サンプル

対照: GAPDH

陽性対照(予後良好): TrkA

陰性対照(予後不良): NMYC

(実施例6) 半定量的PCRによる組織依存的NEDL-1遺伝子発現

ヒト正常組織のmRNA (Clontech社製)を用いて実施例5に示した条件でRT-PCR反応を行った。この反応液を2.5%のアガロースゲルで電気泳動

した。この結果、NEDL-1遺伝子発現の分布はヒト正常組織において組織特異性があることが確認された。結果を図3(a)に示す。対照としてGAPDHを使用した。NEDL-1の発現は、脳、胎児脳、小脳、および腎臓に限局されていた。

【0114】(実施例7) 半定量的PCRによる神経芽腫細胞株依存的NEDL-1遺伝子発現

種々の神経芽腫細胞株からのトータルRNAについて、実施例5に示した条件でRT-PCR反応を行った。この反応液を2.5%のアガロースゲルで電気泳動した。この結果、NEDL-1遺伝子発現の分布は細胞特異性があることが確認された。結果を図3(b)に示す。NEDL-1の発現が見られたのは、SKN-DZ、TGW、KAN、KCN+8、およびLAN-5であった。

【0115】(実施例8) ノザンハイブリダイゼーション

ヒト各組織のポリ(A)+RNAをプロットしたmultiple tissue Northern blotを用いて、NEDL-1 cDNA (<sup>32</sup>Pで標識)をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。対照としてβアクチンcDNAプローブを用いた。結果を図4に示す。脳、腎臓、および胎児脳に約10.0および7.0 kbの2つの転写産物が観察された。

【0116】(実施例9) ユビキチンリガーゼ活性 E2 (Ubch5cまたはUbch7)を発現するバクテリア細胞溶解物の等量をユビキチン、酵母E1、さらにE3 (Nedd4、NEDL-1、またはNEDL2)と37℃で2時間、インキュベートした。続いて、SDS-PAGEで還元条件下、分離して、抗ユビキチン抗体でプロットした。E3 (ユビキチンリガーゼ)として、精製組換えGST-Nedd4、GST-NEDL-1/HECT、およびGST-NEDL2/HECTをそれぞれ使用した。結果を図5に示す。ユビキチン化は、E3の量に依存して増加した(図中、点線で囲まれた部分)。NEDL-1は、陽性対照であるNedd4と同程度のユビキチンリガーゼ活性を示した。

【0117】(実施例11) NEDL-1の細胞内局在

NEDL-1遺伝子の全長をCos7細胞に一過的にトランスフェクトした。48時間後、その細胞を溶解させて、6%ポリアクリルアミド上でSDS-PAGEにかけ、NEDL-1抗体を用いて分析した。各遺伝子産物が約220 kDの位置に検出された。結果を図6(a)に示す。また、内因性発現(CHK134細胞)でも外因性発現(Cos7細胞)でもNEDL-1は、細胞質および細胞膜に主に局在しており、この結果はNedd4ファミリーの他のものともよく一致する(図6(b))。

【0118】(実施例12) NEDL-1とAICDとの相互作用

NEDL-1 WWドメイン領域をDNA結合ドメイン融

合タンパク質として、MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid SYSTEM2 (K1604-1: クロンテックカンパニー)を用いて、定型的なyeast two-hybrid screenを実施した。具体的には、DNA結合ドメインCloning vectorであるpAS2-1 (GenBank ACCESSION:U30497)にインフレームでPCRクローニングし、DNAシークエンサーABI PRISM 377 (Perkin Elmer/B Applied Biosystems)で配列確認を行った。支持酵母細胞株としてCG-1945株を用い、ライブラリーはHuman Fetal Brain MATCHMAKER cDNA Library (Priming Method:Xho I-(dT)15/Vector:pACT2/Cat.#HL4028AH)を使用した。SD(-His,-Trp)YPDプレートで増殖能の検定を行い、HIS3の阻害剤である3-アミノ-1, 2, 4-トリアゾール20 mMを添加したYPD培地でライブラリースクリーニングを行った。HIS+のコロニーをピックアップし、更にβ-ガラクトシダーゼ活性を定法により検定し、陽性クローンを選択した。これらの陽性クローンから定法によりプラスミドDNAを回収した。上述の手順に従い、yeast two-hybrid screenを実行することで複数個見いだされた陽性クローン中にAICD領域を有するクローンが見いだされ、まず当該クローンに注目してさらに検討を進めた。

【0119】当該クローンのAICD領域にEPITOPEとしてFLAG配列(DYKDDDDK)を付加し、CMVプロモーターで発現する哺乳類細胞発現ベクターを構築し、上述のシークエンサーで配列確認後、CMV-NEDL-1発現プラスミドと共に細胞内に一過性に共発現させることで、細胞内での物理的な相互作用が再現できるかどうかの検討を行った。

【0120】Cos7細胞を80% confluentになるよう10% FBSを含むDulbecco's modified Eagle's mediumに維持し、Lipofection法を用いて一過性に各6 μgのDNAを用いて遺伝子導入を行った。リポソーム試薬としてはLipofectAMINE plus (Life Technologies, Inc.)を使用した。48時間後、細胞を氷上にてPBSで2回洗浄し1 ml TNE Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.8 / 1% NP40 / 0.15 M NaCl / 1 mM EDTA / 10 μl aprotinin)を加え、10分間氷上でインキュベートした。その後Eppendorf tubeに移しProtein B-Sepharose (50% slurry)を20 μl添加し、30分4℃で回転し、非特異的結合を排除した。その後15000 rpm / 30分、4℃で遠心し上清をデカンテーションで新しいEppendorf tubeに移し、Protein B-Sepharose 35 μlと抗NED1抗体を10 μl添加し4℃で回転を3時間行った。その後、軽くspin downし、TNE Bufferで4回洗浄した後、TNE buffer 25 μlおよびx2 sample buffer 25 μl加え、5分間ボイルし、泳動サンプルとした。同一蛋白量を15%アクリルアミドゲ



ル、Tricine SDS-PAGEで展開し、PVDF膜に転写後、3%BSAでブロッキングし、1次抗体を抗FLAG-M2抗体(Sigma)、2次抗体をHRPで標識したAnti-Mouse IgG抗体で抗体反応後、ECL Western Blotting Detection Reagent (コード番号RPN2106)で検出した。

【0121】図7は、抗NEDL-1抗体で免疫沈降し、抗FLAG抗体で検出したものである。レーン2、3と6、7はセット、レーン4、5と8、9はセットであり、それぞれ異なる独立した2個のクローンでの結果である。FLAG-AICDがNEDL-1と共沈している(レーン2、3)。単純WESTERN BLOTTINGでFLAG-AICDの蛋白発現バンドは弱く、蛋白の不安定性に起因する(レーン4、5)。レーン4、5/8、9はネガティブコントロールであり、単純WESTERN BLOTTINGでは強い発現がみられるにもかかわらず(レーン8、9)、NEDL-1とは共沈していない(レーン4、5)。図8は、抗FLAG抗体で免疫沈降し、NEDL-1抗体で検出したものである。NEDL-1とFLAG-AICDが共存した場合のみ、強い共沈バンドが得られ(レーン4、5) 10 両者の直接的相互作用がわかる。

【0122】(実施例13) NEDL-1によるBAPPおよびAICDのユビキチン化

実施例12に記載した、yeast two-hybrid screenを実施したが、ハーベスト前にプロテアソームインヒビターMG132、20 $\mu$ Mで2時間処理を行った。その他の実験方法はほぼ実施例12に準じた。免疫沈降の結果を図9に示す。

【0123】図9(a)は、抗HA抗体で免疫沈降させ、抗ユビキチン抗体でプロットしたものである。NEDL-1の存在下、ユビキチン化された細胞内分子の絶対量が増加していることが分かる。図9(b)は、抗FLAG抗体で免疫沈降させ、抗ユビキチン抗体でプロットしたものである。図9(c)および(d)は、抗HA抗体で免疫沈降させ、AICDを認識する抗体でプロットしたものである。 $\beta$ APPを起点として、上方に高分子のスメアバンドが見られ、 $\beta$ APPのユビキチン化が示唆される。図9(a)と図9(c)からNEDL-1の存在下、 $\beta$ APPはユビキチン化を受けることは明らかであるが、その程度は $\beta$ APPの変異(WTとMT)とは無関係である(図9(a)と図9(c)のレーン1および2さらにレーン3および4を参照)。AICDのユビキチン化が図9(a)のレーン5、6と図9(b)のレーン7、8に示されている。FLAG-AICDは、約7KDの分子量である(図9(d))。図9(a)と図9(b)においては、検出に抗ユビキチン抗体を使用しているため、ユビキチン化されていないFLAG-AICDは、現れないが(最下段)、FLAG-AICDに約9KDのユビキチン分子が付加するに従い、約9KDづつ増加したバンドが抗ユビキチン抗体で検出さ 40 50

れ(図中の星印)、AICDのみでも、NEDL-1によってユビキチン化を受けることが分かる。図中、2本線様に見えるバンドは外来性のHAタグが付加されたユビキチンと内在性のタグ無しのユビキチンの分子量差を表している。

【0124】(実施例14) NEDL-1とSOD1変異体との相互作用

実施例12に記載した、yeast two-hybrid screenをSOD1遺伝子で実施した。実験方法はほぼ実施例12に準じた。すなわち、SOD1遺伝子(野生型、変異型)をCMV-NEDL-1と細胞内で一過性に共発現させた。抗NEDL-1抗体で免疫沈降後、洗浄し、泳動サンプル化した。同一蛋白量を15%SDS-PAGEで展開し、PVDF膜に転写し、抗FLAG抗体で抗体反応後、ECLを用いて検出した。その結果を図10(a)に示す。同様に、抗FLAG抗体で免疫沈降後、洗浄し、泳動サンプル化した。同一蛋白量を6%SDS-PAGEで展開し、PVDF膜に転写し、抗NEDL-1抗体で抗体反応後、ECLを用いて検出した。その結果を図10(b)に示す。レーン3において、NEDL-1とSOD1(WT)とは互いに共沈していない。レーン4、5において、発症後急速な臨床経過を辿り、1年以内に死亡する変異であるSOD1(A4V)、SOD1(C6F)はNEDL-1と強く相互作用して、共沈している。レーン6において、発症後緩徐な臨床経過を示し、約40年近く生存可能なSOD1(H46R)はNEDL-1とごく微弱な相互作用しか示さない。レーン7において、発症後特異な神経症状を示す変異であるSOD1(G93A)は、NEDL-1と中等度の相互作用を示す。

【0125】図10に示した試験結果から、NEDL-1は、野生型のSOD1とは相互作用しないが、家族性ALSの原因となるSOD1変異体とは相互作用することが明らかとなった。さらに、その相互作用の程度と臨床上的悪性度の程度はほぼ相関することも分かった。

【0126】(実施例14) NEDL-1によるSOD1変異体のユビキチン化

実施例12に記載した、yeast two-hybrid screenを実施したが、ハーベスト前にプロテアソームインヒビターMG132、20 $\mu$ Mで2時間処理を行った。その他の実験方法はほぼ実施例12に準じた。免疫沈降の結果を図11に示す。ここで、産物をFLAGで免疫沈降させ、抗ユビキチン抗体でプロットしたものである。NEDL-1の非存在下でもSOD1変異体は、ユビキチン化されている。図11のレーン1、3、5、および7を参照。ユビキチン化の程度は3>5>7>1であり、変異体の臨床上的重症度(上記で説明)と相関関係がある。これは細胞内に存在する品質管理を司るユビキチンリガーゼ、例えばDorfin等で処理されている可能性がある(Niwa J., Ishigaki S., Doyu M., Suzuki

T., Tanaka K., Sobue G. A., Novel centrosomal ring-finger protein, dorfins, mediates ubiquitin ligase activity. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2001Mar 2; 281 (3): 706-13)。

【0127】一方、NED-1の存在下、ユビキチン化の程度が劇的に増強することが分かる。図11のレーン2、4、6、および8を参照。ユビキチン化の程度は、ここでも4>6>8>2であり、変異体の臨床上の重症度と相関関係がある。NEDL-1は、SOD1変異体に対して、変異型BAPPとは異なり強くユビキチン化能を発揮する品質管理ユビキチンリガーゼとしての機能を有することが分かる。

【0128】

【発明の効果】以上説明したように、本発明の核酸プローブ或いは本発明のプライマーは、各種ハイブリダイゼーションまたはPCR法に使用でき、NEDL-1遺伝子の神経芽細胞腫のみならず他ヒト組織、細胞での発現の検出や、その構造および機能の解析を可能とする。また、本発明は該遺伝子がコードするNEDL-1タンパク質の遺伝子工学的製造も可能とする。該タンパク質は、ユビキチンリガーゼ活性が確認され、その構造からもHECT型ユビキチンリガーゼであることが明らかと

なった。したがって、ユビキチン-プロテアソーム系におけるNEDL-1タンパク質の基質の同定が可能となり、それが関与する神経変性疾患の治療の可能性を開く。実際、NEDL-1が $\beta$ APP、AICDやSOD1(変異型)と相互作用することが確かめられた。さらに、これらの相互作用がユビキチン化を介していることも確かめられた。

【0129】また、本発明に係る核酸は、予後良好な神経芽細胞腫で発現が増強されているNEDL-1遺伝子に由来する核酸であり、従って、これらの核酸に基づく遺伝子情報により神経芽細胞腫の予後の診断が可能となる。該遺伝子は、N-myc遺伝子が予後不良因子であるのに対して、TrkA遺伝子と同様に予後良好因子と見なされるので、神経芽細胞腫の悪性度および抗癌剤に対する感受性の指標(腫瘍マーカー)となり得る。具体的には、本発明の核酸プローブ或いは本発明のプライマーを用いて、神経芽細胞腫の予後診断剤または診断用キットを構成し、臨床組織サンプルからNEDL-1遺伝子若しくはNEDL-1タンパク質を検定し、予後の診断を行う。

【0130】

【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

<110> Hisamitsu Pharmaceutical Co., Inc.

<120> Novel gene NEDL-1

<130> HMS952

<140> JP 2001-254974

<141> 2001-8-24

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1585

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic polynucleotide

<400> 1

Met Ala Ser Pro Ser Arg Asn Ser Gln Ser Arg Arg Arg Cys Lys Glu

1 5 10 15

Pro Leu Arg Tyr Ser Tyr Asn Pro Asp Gln Phe His Asn Met Asp Leu

20 25 30

Arg Gly Gly Pro His Asp Gly Val Thr Ile Pro Arg Ser Thr Ser Asp

35 40 45

Thr Asp Leu Val Thr Ser Asp Ser Arg Ser Thr Leu Met Val Ser Ser

50 55 60

Ser Tyr Tyr Ser Ile Gly His Ser Gln Asp Leu Val Ile His Trp Asp

65 70 75 80

Ile Lys Glu Glu Val Asp Ala Gly Asp Trp Ile Gly Met Tyr Leu Ile  
                             85                            90                            95  
 Asp Glu Val Leu Ser Glu Asn Phe Leu Asp Tyr Lys Asn Arg Gly Val  
                             100                            105                            110  
 Asn Gly Ser His Arg Gly Gln Ile Ile Trp Lys Ile Asp Ala Ser Ser  
                             115                            120                            125  
 Tyr Phe Val Glu Pro Glu Thr Lys Ile Cys Phe Lys Tyr Tyr His Gly  
                             130                            135                            140  
 Val Ser Gly Ala Leu Arg Ala Thr Thr Pro Ser Val Thr Val Lys Asn  
                             145                            150                            155                            160  
 Ser Ala Ala Pro Ile Phe Lys Ser Ile Gly Ala Asp Glu Thr Val Gln  
                             165                            170                            175  
 Gly Gln Gly Ser Arg Arg Leu Ile Ser Phe Ser Leu Ser Asp Phe Gln  
                             180                            185                            190  
 Ala Met Gly Leu Lys Lys Gly Met Phe Phe Asn Pro Asp Pro Tyr Leu  
                             195                            200                            205  
 Lys Ile Ser Ile Gln Pro Gly Lys His Ser Ile Phe Pro Ala Leu Pro  
                             210                            215                            220  
 His His Gly Gln Glu Arg Arg Ser Lys Ile Ile Gly Asn Thr Val Asn  
                             225                            230                            235                            240  
 Pro Ile Trp Gln Ala Glu Gln Phe Ser Phe Val Ser Leu Pro Thr Asp  
                             245                            250                            255  
 Val Leu Glu Ile Glu Val Lys Asp Lys Phe Ala Lys Ser Arg Pro Ile  
                             260                            265                            270  
 Ile Lys Arg Phe Leu Gly Lys Leu Ser Met Pro Val Gln Arg Leu Leu  
                             275                            280                            285  
 Glu Arg His Ala Ile Gly Asp Arg Val Val Ser Tyr Thr Leu Gly Arg  
                             290                            295                            300  
 Arg Leu Pro Thr Asp His Val Ser Gly Gln Leu Gln Phe Arg Phe Glu  
                             305                            310                            315                            320  
 Ile Thr Ser Ser Ile His Pro Asp Asp Glu Glu Ile Ser Leu Ser Thr  
                             325                            330                            335  
 Glu Pro Glu Ser Ala Gln Ile Gln Asp Ser Pro Met Asn Asn Leu Met  
                             340                            345                            350  
 Glu Ser Gly Ser Gly Glu Pro Arg Ser Glu Ala Pro Glu Ser Ser Glu  
                             355                            360                            365  
  
 Ser Trp Lys Pro Glu Gln Leu Gly Glu Gly Ser Val Pro Asp Arg Pro  
                             370                            375                            380  
 Gly Asn Gln Ser Ile Glu Leu Ser Arg Pro Ala Glu Glu Ala Ala Val  
                             385                            390                            395                            400  
 Ile Thr Glu Ala Gly Asp Gln Gly Met Val Ser Val Gly Pro Glu Gly  
                             405                            410                            415  
 Ala Gly Glu Leu Leu Ala Gln Val Gln Lys Asp Ile Gln Pro Ala Pro  
                             420                            425                            430  
 Ser Ala Glu Glu Leu Ala Glu Gln Leu Asp Leu Gly Glu Glu Ala Ser  
                             435                            440                            445  
 Ala Leu Leu Leu Glu Asp Gly Glu Ala Pro Ala Ser Thr Lys Glu Glu  
                             450                            455                            460  
 Pro Leu Glu Glu Glu Ala Thr Thr Gln Ser Arg Ala Gly Arg Glu Glu

465                      470                      475                      480  
 Glu Glu Lys Glu Gln Glu Glu Glu Gly Asp Val Ser Thr Leu Glu Gln  
                                  485                      490                      495  
 Gly Glu Gly Arg Leu Gln Leu Arg Ala Ser Val Lys Arg Lys Ser Arg  
                                  500                      505                      510  
 Pro Cys Ser Leu Pro Val Ser Glu Leu Glu Thr Val Ile Ala Ser Ala  
                                  515                      520                      525  
  
 Cys Gly Asp Pro Glu Thr Pro Arg Thr His Tyr Ile Arg Ile His Thr  
                                  530                      535                      540  
 Leu Leu His Ser Met Pro Ser Ala Gln Gly Gly Ser Ala Ala Glu Glu  
 545                                   550                                   555                                   560  
 Glu Asp Gly Ala Glu Glu Ser Thr Leu Lys Asp Ser Ser Glu Lys  
                                  565                                   570                                   575  
 Asp Gly Leu Ser Glu Val Asp Thr Val Ala Ala Asp Pro Ser Ala Leu  
                                  580                                   585                                   590  
 Glu Glu Asp Arg Glu Glu Pro Glu Gly Ala Thr Pro Gly Thr Ala His  
                                  595                                   600                                   605  
 Pro Gly His Ser Gly Gly His Phe Pro Ser Leu Ala Asn Gly Ala Ala  
                                  610                                   615                                   620  
 Gln Asp Gly Asp Thr His Pro Ser Thr Gly Ser Glu Ser Asp Ser Ser  
 625                                   630                                   635                                   640  
 Pro Arg Gln Gly Gly Asp His Ser Cys Glu Gly Cys Asp Ala Ser Cys  
                                  645                                   650                                   655  
 Cys Ser Pro Ser Cys Tyr Ser Ser Ser Cys Tyr Ser Thr Ser Cys Tyr  
                                  660                                   665                                   670  
 Ser Ser Ser Cys Tyr Ser Ala Ser Cys Tyr Ser Pro Ser Cys Tyr Asn  
                                  675                                   680                                   685  
 Gly Asn Arg Phe Ala Ser His Thr Arg Phe Ser Ser Val Asp Ser Ala  
                                  690                                   695                                   700  
 Lys Ile Ser Glu Ser Thr Val Phe Ser Ser Gln Asp Asp Glu Glu Glu  
 705                                   710                                   715                                   720  
 Glu Asn Ser Ala Phe Glu Ser Val Pro Asp Ser Met Gln Ser Pro Glu  
                                  725                                   730                                   735  
 Leu Asp Pro Glu Ser Thr Asn Gly Ala Gly Pro Trp Gln Asp Glu Leu  
                                  740                                   745                                   750  
 Ala Ala Pro Ser Gly His Val Glu Arg Ser Pro Glu Gly Leu Glu Ser  
                                  755                                   760                                   765  
 Pro Val Ala Gly Pro Ser Asn Arg Arg Glu Gly Glu Cys Pro Ile Leu  
                                  770                                   775                                   780  
 His Asn Ser Gln Pro Val Ser Gln Leu Pro Ser Leu Arg Pro Glu His  
 785                                   790                                   795                                   800  
 His His Tyr Pro Thr Ile Asp Glu Pro Leu Pro Pro Asn Trp Glu Ala  
                                  805                                   810                                   815  
 Arg Ile Asp Ser His Gly Arg Val Phe Tyr Val Asp His Val Asn Arg  
                                  820                                   825                                   830  
  
 Thr Thr Thr Trp Gln Arg Pro Thr Ala Ala Ala Thr Pro Asp Gly Met  
                                  835                                   840                                   845  
 Arg Arg Ser Gly Ser Ile Gln Gln Met Glu Gln Leu Asn Arg Arg Tyr

850 855 860  
 Gln Asn Ile Gln Arg Thr Ile Ala Thr Glu Arg Ser Glu Glu Asp Ser  
 865 870 875 880  
 Gly Ser Gln Ser Cys Glu Gln Ala Pro Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly  
 885 890 895  
 Gly Ser Asp Ser Glu Ala Glu Ser Ser Gln Ser Ser Leu Asp Leu Arg  
 900 905 910  
 Arg Glu Gly Ser Leu Ser Pro Val Asn Ser Gln Lys Ile Thr Leu Leu  
 915 920 925  
 Leu Gln Ser Pro Ala Val Lys Phe Ile Thr Asn Pro Glu Phe Phe Thr  
 930 935 940  
 Val Leu His Ala Asn Tyr Ser Ala Tyr Arg Val Phe Thr Ser Ser Thr  
 945 950 955 960  
 Cys Leu Lys His Met Ile Leu Lys Val Arg Arg Asp Ala Arg Asn Phe  
 965 970 975  
 Glu Arg Tyr Gln His Asn Arg Asp Leu Val Asn Phe Ile Asn Met Phe  
 980 985 990  
  
 Ala Asp Thr Arg Leu Glu Leu Pro Arg Gly Trp Glu Ile Lys Thr Asp  
 995 1000 1005  
 Gln Gln Gly Lys Ser Phe Phe Val Asp His Asn Ser Arg Ala Thr Thr  
 1010 1015 1020  
 Phe Ile Asp Pro Arg Ile Pro Leu Gln Asn Gly Arg Leu Pro Asn His  
 1025 1030 1035 1040  
 Leu Thr His Arg Gln His Leu Gln Arg Leu Arg Ser Tyr Ser Ala Gly  
 1045 1050 1055  
 Glu Ala Ser Glu Val Ser Arg Asn Arg Gly Ala Ser Leu Leu Ala Arg  
 1060 1065 1070  
 Pro Gly His Ser Leu Val Ala Ala Ile Arg Ser Gln His Gln His Glu  
 1075 1080 1085  
 Ser Leu Pro Leu Ala Tyr Asn Asp Lys Ile Val Ala Phe Leu Arg Gln  
 1090 1095 1100  
 Pro Asn Ile Phe Glu Met Leu Gln Glu Arg Gln Pro Ser Leu Ala Arg  
 1105 1110 1115 1120  
 Asn His Thr Leu Arg Glu Lys Ile His Tyr Ile Arg Thr Glu Gly Asn  
 1125 1130 1135  
 His Gly Leu Glu Lys Leu Ser Cys Asp Ala Asp Leu Val Ile Leu Leu  
 1140 1145 1150  
 Ser Leu Phe Glu Glu Glu Ile Met Ser Tyr Val Pro Leu Gln Ala Ala  
 1155 1160 1165  
 Phe His Pro Gly Tyr Ser Phe Ser Pro Arg Cys Ser Pro Cys Ser Ser  
 1170 1175 1180  
 Pro Gln Asn Ser Pro Gly Leu Gln Arg Ala Ser Ala Arg Ala Pro Ser  
 1185 1190 1195 1200  
 Pro Tyr Arg Arg Asp Phe Glu Ala Lys Leu Arg Asn Phe Tyr Arg Lys  
 1205 1210 1215  
 Leu Glu Ala Lys Gly Phe Gly Gln Gly Pro Gly Lys Ile Lys Leu Ile  
 1220 1225 1230  
 Ile Arg Arg Asp His Leu Leu Glu Gly Thr Phe Asn Gln Val Met Ala  
 1235 1240 1245

Tyr Ser Arg Lys Glu Leu Gln Arg Asn Lys Leu Tyr Val Thr Phe Val  
 1250 1255 1260  
 Gly Glu Glu Gly Leu Asp Tyr Ser Gly Pro Ser Arg Glu Phe Phe Phe  
 1265 1270 1275 1280  
 Leu Leu Ser Gln Glu Leu Phe Asn Pro Tyr Tyr Gly Leu Phe Glu Tyr  
 1285 1290 1295  
  
 Ser Ala Asn Asp Thr Tyr Thr Val Gln Ile Ser Pro Met Ser Ala Phe  
 1300 1305 1310  
 Val Glu Asn His Leu Glu Trp Phe Arg Phe Ser Gly Arg Ile Leu Gly  
 1315 1320 1325  
 Leu Ala Leu Ile His Gln Tyr Leu Leu Asp Ala Phe Phe Thr Arg Pro  
 1330 1335 1340  
 Phe Tyr Lys Ala Leu Leu Arg Leu Pro Cys Asp Leu Ser Asp Leu Glu  
 1345 1350 1355 1360  
 Tyr Leu Asp Glu Glu Phe His Gln Ser Leu Gln Trp Met Lys Asp Asn  
 1365 1370 1375  
 Asn Ile Thr Asp Ile Leu Asp Leu Thr Phe Thr Val Asn Glu Glu Val  
 1380 1385 1390  
 Phe Gly Gln Val Thr Glu Arg Glu Leu Lys Ser Gly Gly Ala Asn Thr  
 1395 1400 1405  
 Gln Val Thr Glu Lys Asn Lys Lys Glu Tyr Ile Glu Arg Met Val Lys  
 1410 1415 1420  
 Trp Arg Val Glu Arg Gly Val Val Gln Gln Thr Glu Ala Leu Val Arg  
 1425 1430 1435 1440  
 Gly Phe Tyr Glu Val Val Asp Ser Arg Leu Val Ser Val Phe Asp Ala  
 1445 1450 1455  
  
 Arg Glu Leu Glu Leu Val Ile Ala Gly Thr Ala Glu Ile Asp Leu Asn  
 1460 1465 1470  
 Asp Trp Arg Asn Asn Thr Glu Tyr Arg Gly Gly Tyr His Asp Gly His  
 1475 1480 1485  
 Leu Val Ile Arg Trp Phe Trp Ala Ala Val Glu Arg Phe Asn Asn Glu  
 1490 1495 1500  
 Gln Arg Leu Arg Leu Leu Gln Phe Val Thr Gly Thr Ser Ser Val Pro  
 1505 1510 1515 1520  
 Tyr Glu Gly Phe Ala Ala Leu Arg Gly Ser Asn Gly Leu Arg Arg Phe  
 1525 1530 1535  
 Cys Ile Glu Lys Trp Gly Lys Ile Thr Ser Leu Pro Arg Ala His Thr  
 1540 1545 1550  
 Cys Phe Asn Arg Leu Asp Leu Pro Pro Tyr Pro Ser Tyr Ser Met Leu  
 1555 1560 1565  
 Tyr Glu Lys Leu Leu Thr Ala Val Glu Glu Thr Ser Thr Phe Gly Leu  
 1570 1575 1580  
 Glu  
 1585

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 6200

&lt;212&gt; DNA

<213>: Artificial Sequence

<220>:

<223>: Description of Artificial Sequence:synthetic polynucleotide

<400>: 2

```

ggtttttagg cctggccgcc atggcgtctc cttctagaaa ctcccagagc cgacgccggt 60
gcaaggagcc gctccgatac agctacaacc ccgaccagtt ccacaacatg gacctcaggg 120
gcggcccccga cgatggcgtc accattcccc gctccaccag cgacactgac ctggtcacct 180
cggacagccg ctccacgctc atggtcagca gctcctacta ttccatcggg cactctcagg 240
acctgtgcat ccactggggac ataaaggagg aagtggacgc tggggactgg attggcatgt 300
acctcattga tgggtcttg tccgaaaact ttctggacta taaaaaccgt ggagtcaatg 360
gttctcatcg gggccagatc atctggaaga tcgatgccag ctctactttt gtggaacctg 420
aaactaagat ctgcttcaaa tactaccatg gagtgagtg ggccctgcga gcaaccacc 480
ccagtgtcac ggtcaaaaac tcggcagctc ctatitttaa aagcattggt gctgatgaga 540
ccgtccaagg acaaggaggt cggaggctga tcagcttctc tctctcagat ttccaagcca 600
tggggttgaa gaaagggatg tttttcaacc cagaccctta tctgaagatt tccattcagc 660
ctgggaaaca cagcatcttc cccgccctcc ctccaccatg acaggagagg agatccaaga 720
tcataggcaa caccgtgaac cccatctggc aggcggagca attcagtttt gtgtccttgc 780
ccactgacgt gctggaaatt gaggtgaagg acaagtttgc caagagccgc cccatcatca 840
agcgttctt gggaaagctg tcgatgccc ttcaaagact cctggagaga cagccatag 900
gggatagggt ggtcagctac acacttggcc gcaggcttcc aacagatcat gtgagtgagc 960
agctgcaatt ccgatttgag atcacttcct ccatccacc agatgatgag gagatttccc 1020
tgagtaccga gcctgagtc gcccaaatc aggcagccc catgaacaac ctgatgaaa 1080
gcggcagtg ggaacctcg tctgaggcac cagagtcctc tgagagctgg aagccagagc 1140
agctgggtga gggcagtgtc ccgatcgtc cagggaacca aagcatagag ctttccagac 1200
cagctgagga agcagcagtc atcacggagg caggagacca ggcatgtgc tctgtgggac 1260
ctgaaggggc tggggagctc ctggcccagg tgcaaaagga catccagcct gccccagtg 1320
cagaagagct ggccgagcag ctggacctgg gtgaggagcc atcagcactg ctgctggaag 1380
acgggtgaag cccagccagc accaaggagg agcccttgga ggaggagca acgaccaga 1440
gccggctgg aagggaagaa gaggagaagg agcaggagga ggaggagat gtgtccacc 1500
tgagagcagg agagggcagg ctgcagctgc gggcctcggg gaagagaaaa agcaggccct 1560
gtcccttgc tgtgtccgag ctggagacgg tgatcgctc agcctgcggg gaccccagag 1620
ccccgcggac aactacatc cgcatccaca ccctgctgca cagcatgccc tccgccagg 1680
gcggcagcgc ggcagaggag gaggacggcg cggaggagga gtccacctc aaggactcct 1740
cggagaagga tgggtcagc gaggtggaca cggtgccgc tgacctgtc gccctggaag 1800
aggacagaga agagcccgag ggggctactc caggcacggc gcacctggc cactccgggg 1860
gccacttccc cagcctggcc aatggcgcgg ccaggatgg cgacacgcac ccagcaccg 1920
ggagcgagag cgactccagc ccaggcgaag gcggggacca cagttcgag ggctgtgacg 1980
cgtcctgctg cagcccctcg tgctacagct cctcgtgcta cagcacgtcc tgctacagca 2040
gtcctgtgta cagcgcctcg tgctacagcc cctcctgcta caacggcaac aggttcgcca 2100
gccacacgcg cttctcctcc gtggacagcg ccaagatctc cgagagcacg gtcttctct 2160
cgcaagacga caggaggag gagaacagcg cgttcgagtc ggtaccgac tccatgcaga 2220
gccctgagct ggacccggag tccacgaac gcgctgggccc gtggcaagac gagctggccc 2280
cccctagcgg gcacgtgaa agaagccggg aaggtctgga atcccccggt gcagggtcaa 2340
gcaatcgag agaaagtgaa tgcctatac tccataattc ccagccagta agccagcttc 2400
cttccctgag gcctgaacat catcactacc caacaatoga tgagcctctt ccacaaaact 2460
gggaagctcg aattgacagc cacggcgggg tctttatgt ggaccacgtg aaccgcacaa 2520
ccacctggca gcgtccgacg gcagcagcca cccggatgg catgcggaga tcggggtcca 2580
tccagcagat ggagcaactc aacaggcggg atcaaaacat tcagcgaacc attgcaacag 2640
agaggtccga agaagattct ggcagccaaa gctgcgagca agcccagca ggaggaggcg 2700

```



gaggtggagg gactgactca gaagccgaat ctccccagtc cagcttagat ctaaggagag 2760  
aggggtcact ttctccagtg aactcacaaa aaatcacctt gctgctgcag tccccagcgg 2820  
tcaagttcat caccaacccc gatttcttca ctgtgctaca tgccaattat agtgcctacc 2880  
gagtccttac cagtagcacc tgcctaaagc acatgattct gaaagtcga cgggatgctc 2940  
gcaattttga acgctaccag cacaaccggg acttggtgaa ttcatcaac atgttcgcag 3000  
acactcggct ggaactgccc cggggctggg agatcaaaac ggaccagcag ggaaagtctt 3060  
ttttcgtgga ccacaacagt cgagctacca ctttcattga cccccaatc cctcttcaga 3120  
acggctcgtc tccaatcat ctaactcacc gacagcacct ccagaggctc cgaagtaca 3180  
gcgctggaga ggcctcagaa gtttctagaa acagaggagc ctctttactg gccaggccag 3240  
gacacagctt agtagctgct attcgaagcc aacatcaaca tgagtcattg ccactggcat 3300  
ataatgacaa gattgtggca tttcttcgcc agccaaacat tttgaaatg ctgcaagagc 3360  
gtcagccaag cttagcaaga aaccacacac tcaggggagaa aatccattac attcggactg 3420  
agggtaatca cgggcttgag aagttgtcct gtgatgcgga tctggtcatt ttgctgagtc 3480  
tctttgaaga agagattatg tctacgtcc cctgcaggc tgccttcac cctgggtata 3540  
gcttctctcc ccgctgttca cctgttctt cacctcagaa ctccccaggt ttacagagag 3600  
ccagtgaag agcccttcc cctaccgaa gagactttga ggccaagctc cgcaatttct 3660  
acagaaaact ggaagccaaa ggatttggc agggctccggg gaaaattaag ctcatattc 3720  
gccgggatca tttgttgag ggaaccttca atcagggtgat ggctattcg cggaaagagc 3780  
tcacgcgaaa caagctctac gtcaccttg ttgagagga ggcctggac tacagtggcc 3840  
cctcgcggga gttcttctc cttctgtctc aggagctctt caacccttac tatggactct 3900  
ttgagtactc ggcaaatgat acttacacgg tgcagatcag ccccatgtcc gcattttag 3960  
aaaaccatct tgagtgttc agtttagcg gtgcctcct gggtctggct ctgatccatc 4020  
agtaccttct tgacgtttc ttacagaggc cctctacaa ggcactcctg agactgccct 4080  
gtgatttgag tgacctggaa tatttggatg aggaattcca ccagatttg cagtggatga 4140  
aggacaacaa catcacagac atcttagacc tcactttcac tgttaatgaa gaggtttttg 4200  
gacaggtcac ggaaggagg ttgaagtctg gaggagccaa cacacagggt acggagaaaa 4260  
acaagaagga gtacatcgag cgcattgtga agtggcgggt ggagcgcggc gtgttacagc 4320  
agaccgagc gctggtcgc gcttctacg aggtttaga ctgaggctg gtgtccgtgt 4380  
ttgatccag ggagctggag ctggtgatag ctggcaccgc ggaatcgac ctaaatgact 4440  
ggcggaataa cactgagtac cggggagggt accacgatgg gcattctgt atccgctggt 4500  
tctgggctgc ggtggagcgc ttcaataatg agcagaggct gagattactg cagtttgtca 4560  
cgggaacatc cagcgtgcc tacgaaggct tcgcagccct ccgtgggagc aatgggcttc 4620  
ggcgcttctg catagagaaa tgggggaaaa ttacttctct cccagggca cacacatgct 4680  
tcaaccgact ggatcttcca ccgtatccct cgtactccat gttgtatgaa aagctgttaa 4740  
cagcagtaga ggaaccagc accttggac ttgagttagg acatggaacc tcgcctgaca 4800  
tttctctgca cagtacatc acccttctg ggatgatccc ctttccctt tcccttaac 4860  
aaactcctt tgattttgt attccatgat ttttatttc aaacaaatc aggattgaca 4920  
aaagctgtgc atgaagaact gccttctct aagatctaac cttcaggctt ctctcctctg 4980  
ttttcaatga actgctagcc tgtatgcaat attaaaaac agctgtctca aggtctgtgt 5040  
atatctccac atacctccat tactaacaat gaaatatgaa tgcaagttaa gctacacttg 5100  
accaaatggt aataaatgtt tacttccatt tctatcattg aagggaaaat gtgagcatta 5160  
agcactccag gcttcatat gccatgtct tctgagcaga gccaccattt ttataattt 5220  
ctaataacca actccagAAC taggagctga tcaactctt gtttctctt ccatctactt 5280  
ttccctgtgc ataatatcca tccaaaggac aacagtggca aagctgaaat tttatacat 5340  
tcaactcatg attcacatgt ggcacatgct ccatcagccg gaactagcct agacatacgg 5400  
tgcaaatatg acacttctaa cgattaacaa cagcaagaaa acacctgctg ctgatgcaat 5460  
gcaatgcac ccaatggtt tggggattgt gggctcaact caagagaagt ttaggagggg 5520  
gagcatccct agtgaatact cacaccacaa gaaggacaaa ctgtgcaca tgtccaagaa 5580  
agaaagcttc ttgattgagg tagcatgaag gatgaggctt cagccccat tgtcttatgt 5640  
agaatgtggc aatgccaact ggagaaaggg aagaaggaca tattaccttg gttgaatcc 5700

```

ctgagttctg tacigtctg ttttgtttag tctagccaca gttcttcaca aaggaaaaaa 5760
aaatgtgtag atgataccat gacttttggt aaagccatga cttttgttg cttggcagac 5820
aaaccctttt tttaaaactt tgatattttt ttttcacatt ttttttcctt ttcctttctt 5880
aatcatggag ttcaagttcc ttgtcattcg attgtccatc gggaccacac taggaagctg 5940
cagagagtga tgggtgcttg tagggatcaa gggcaacata gtacttctcc ttcaccata 6000
gtaatcctcc tggggcagaa acataacacc ccaaaggcac gttgattgt atcaaaataa 6060
atatccagtt tcttttagca ttcagtgaac acatatctca gaaaacttca tgtgtgcaga 6120
aaaacagctg caggctccaa agacagccta acctctcaac tacatttgaa ataaacccaa 6180
ccataatggt aaaaaaaaaa 6200

```

<210>: 3

<211>: 18

<212>: DNA

<213>: Artificial Sequence

<220>:

<223>: Description of Artificial Sequence:synthetic

polynucleotide

<400>: 3

ctgcaccaac aatatccc

18

<210>: 4

<211>: 18

<212>: DNA

<213>: Artificial Sequence

<220>:

<223>: Description of Artificial Sequence:synthetic

polynucleotide

<400>: 4

gtagagacag ggtttcac

7

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】(a)は、HECT型ユビキチンリガーゼ類のタンパク質構造を模式的に示す図であり、いずれもC末端側にHECTドメイン、中央部に複数のWWドメイン、N末端側にC2ドメインを有することを示している。(b)は、NEDL-1タンパク質のアミノ酸配列とNEDL2タンパク質のアミノ酸配列とのホモロジー解析を表すアラインメント図である。前記各ドメインは、下線を施すか、箱で囲まれて表示されている。また、保存アミノ酸は、星印で表示されている。

【図2】半定量的RT-PCRによって、予後良好・不良神経芽細胞腫の臨床組織サンプルにおけるNEDL-1遺伝子の発現を測定した結果を示す電気泳動図である。

【図3】(a)は、半定量的RT-PCRによって、正常ヒト組織におけるNEDL-1遺伝子の発現を測定した結果を示す電気泳動写真に対応する図である。(b)は、半定量的RT-PCRによって、各種の神経芽細胞腫株におけるNEDL-1遺伝子の発現を測定した結果を示す電気泳動写真に対応する図である。

【図4】正常ヒト組織におけるNEDL-1遺伝子の組織別発現をノーザンプロットによって分析したオートラ

ジオグラフィーを表す図である。

【図5】NEDL-1タンパク質のユビキチンリガーゼ活性を示すイムノプロットした電気泳動図である。

【図6】NEDL-1遺伝子の細胞内局在化を表すウェスタンプロット図である。(a)は、Cos7細胞、(b)はCHP134細胞での結果を表す。

【図7】NEDL-1タンパク質のAICDとの相互作用を示すイムノプロットした電気泳動図であり、抗NEDL-1抗体で免疫沈降させ、抗FLAG抗体で検出したものである。

【図8】NEDL-1タンパク質のAICDとの相互作用を示すイムノプロットした電気泳動図であり、抗FLAG抗体で免疫沈降させ、抗NEDL-1抗体で検出したものである。

【図9】(a)は、NEDL-1タンパク質の $\beta$ APPおよびAICDに対するユビキチン化を示すイムノプロットした電気泳動図であり、抗HA抗体で免疫沈降させ、抗ユビキチン抗体で検出したものである。(b)は、NEDL-1タンパク質のFLAG-AICDに対するユビキチン化を示すイムノプロットした電気泳動図であり、抗FLAG抗体で免疫沈降させ、抗ユビキチン抗体で検出したものである。(c)は、NEDL-1タンパク質の

50

$\beta$ APPおよびAICDに対するユビキチン化を示すイムノブロットした電気泳動図であり、抗HA抗体で免疫沈降させ、AICDを認識する抗体で検出したものである。

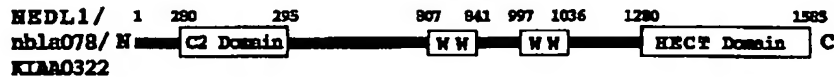
【図10】(a)は、NEDL-1タンパク質のSOD1変異体との相互作用を示すイムノブロットした電気泳動図であり、抗NEDL-1抗体で免疫沈降させ、抗FL

AG抗体で検出したものである。(b)は、NEDL-1タンパク質のSOD1変異体との相互作用を示すイムノブロットした電気泳動図であり、抗FLAG抗体で免疫沈降させ、抗NEDL-1抗体で検出したものである。

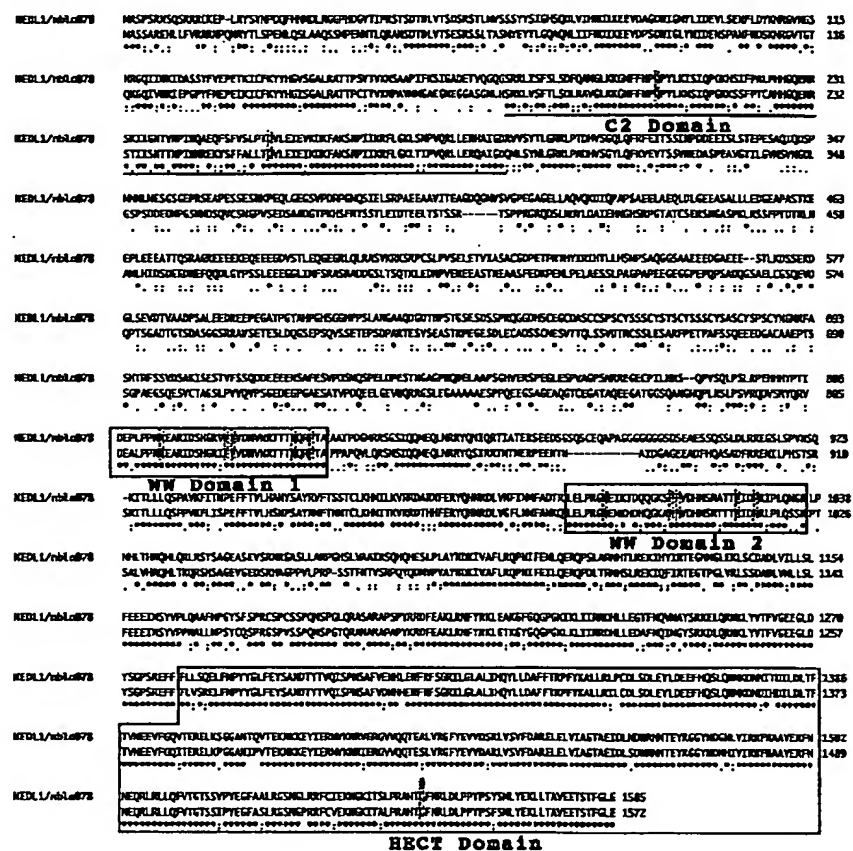
【図11】NEDL-1タンパク質のSOD1およびSOD1変異体に対するユビキチン化を示すイムノブロットした電気泳動図である。

【図1】

(a)



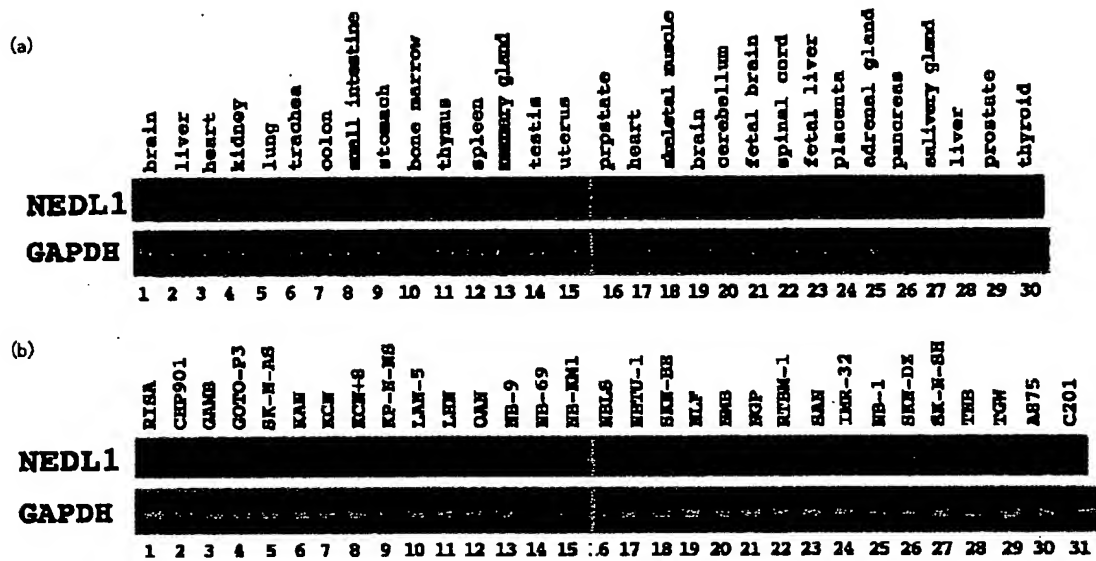
(b)



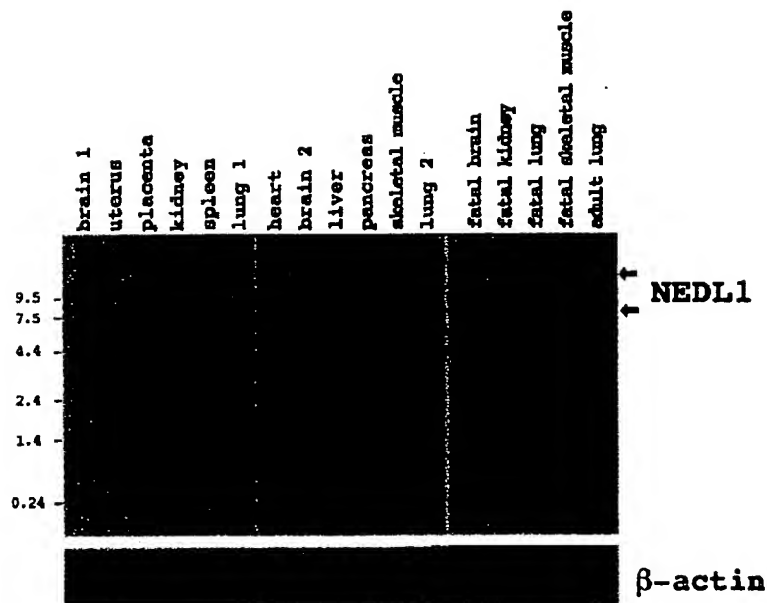
【図2】



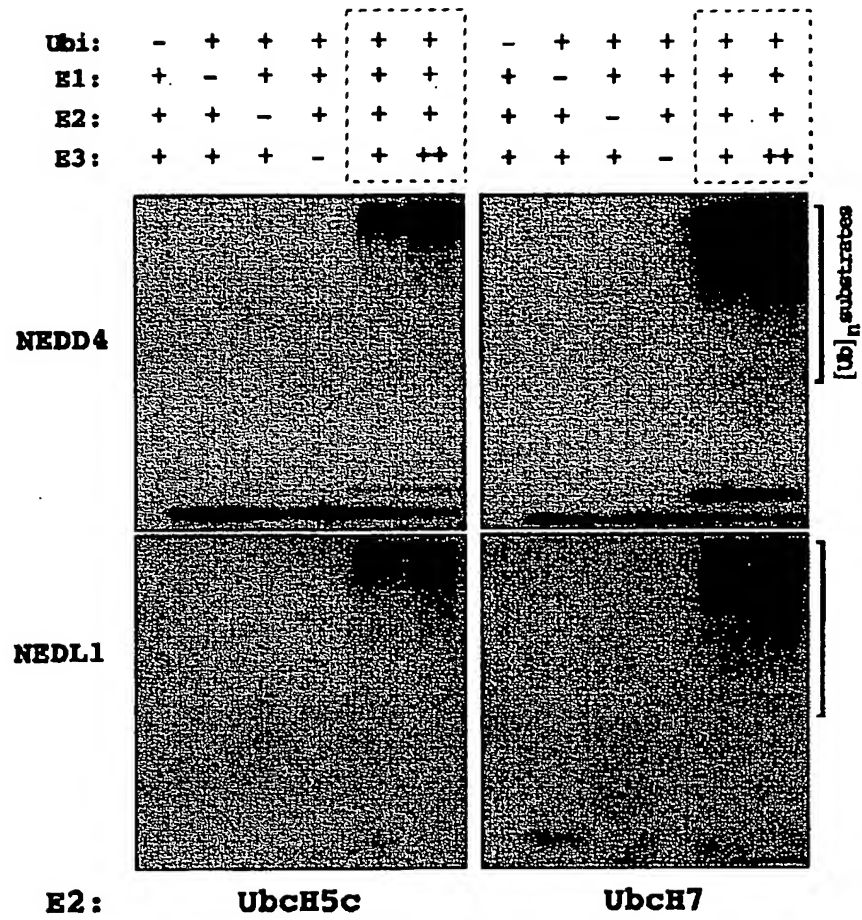
【図3】



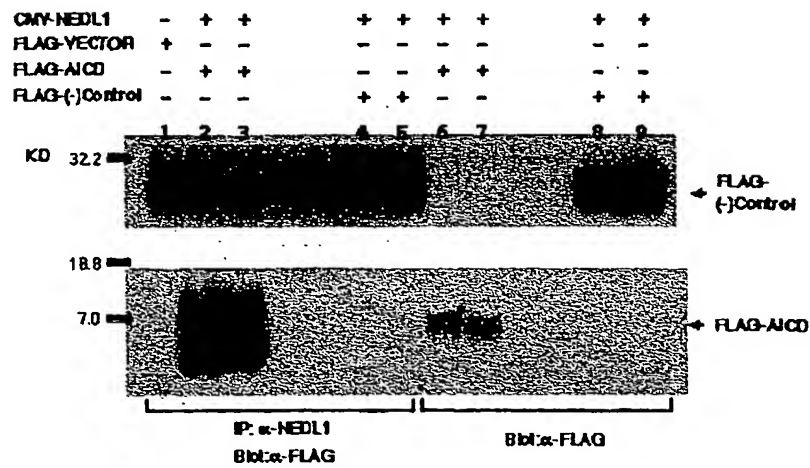
【図4】



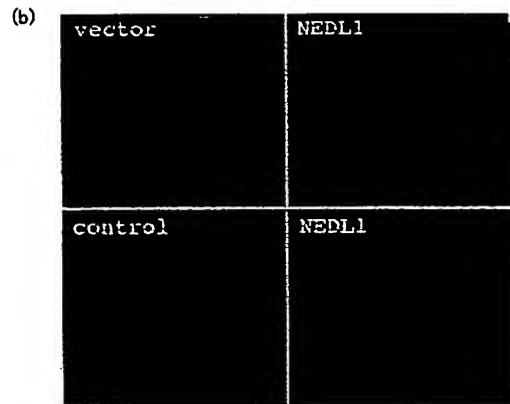
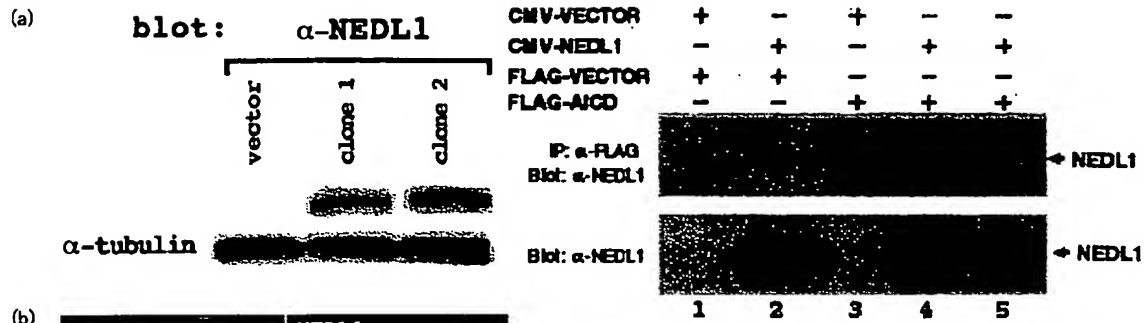
【図5】



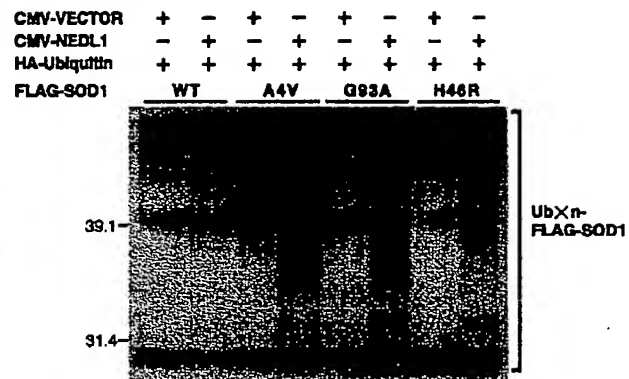
【図7】



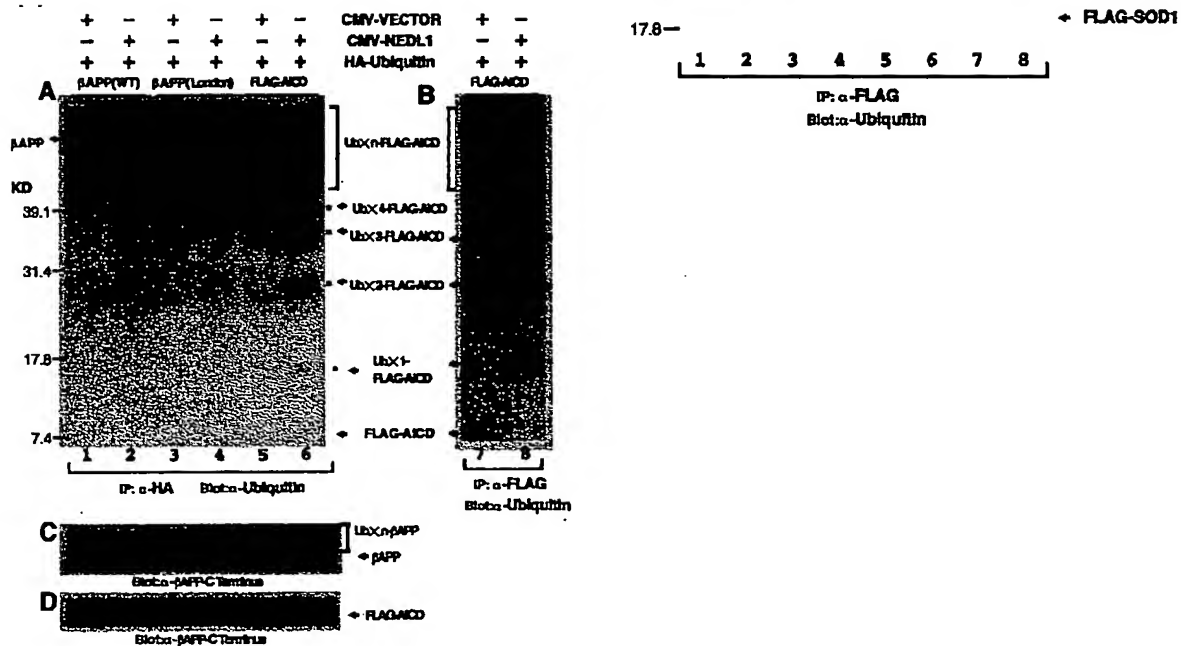
【图 8】



【圖 11】

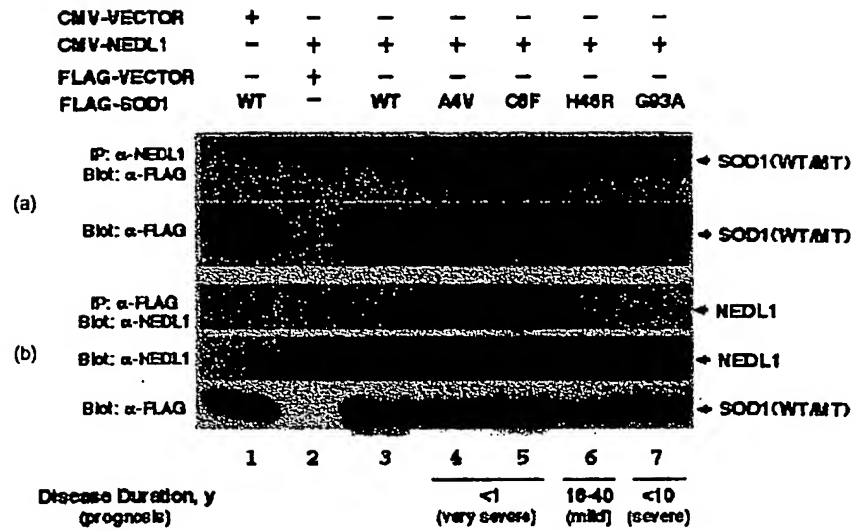


【图9】





【図10】



フロントページの続き

(72)発明者 宮崎 耕

千葉県千葉市緑区おゆみ野948-28 プロ

ムナード201

Fターム(参考) 4B024 AA11 BA07 CA04 CA09 DA02

DA06 EA04 GA11 GA18 GA19

HA03 HA14

4B063 QA01 QA18 QQ02 QQ40 QQ42

QR31 QR38 QR55 QR72 QR82

QS12 QS16 QS24 QS25 QS34

QS39 QX02 QX07

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record.**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINE(S) OR MARK(S) ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**